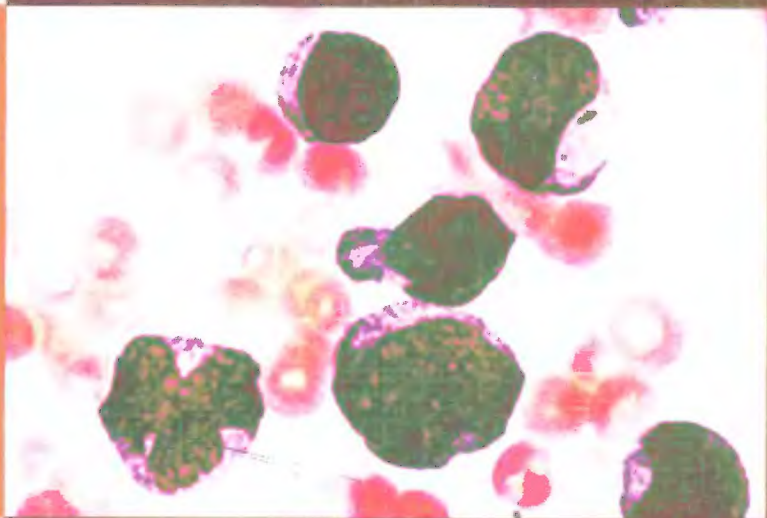


VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Е.Б.Владимирская

*Биологические основы
противоопухолевой
терапии*



**Владимирская Е.Б. Биологические основы противоопухолевой терапии - М.,
Агат-Мед, 2001, 110 стр. с илл.
ISBN 5-93782-011-8**

Предлагаемая монография представляет современные данные, характеризующие особенности опухолевого роста, от которых зависит реакция опухолевых клеток на лекарственные препараты. Монография состоит из 4-х очерков, являющихся концептуальным анализом основных факторов, определяющих ответ опухоли на лекарственное воздействие.

В очерке 1 представлена роль апоптоза в формировании опухолевого роста и реализации киллерной функции противоопухолевой терапии. Рассматриваются механизмы апоптотической смерти клеток в физиологических условиях, при опухолевой трансформации и под воздействием химиотерапии. Описывается новая стратегия противоопухолевой терапии, основанная на коррекции сигнальных путей апоптоза в опухолевых клетках.

Очерк 2 посвящен цитокиновой регуляции кроветворения и роли ростовых факторов в формировании опухолевого роста. Описаны особенности взаимодействия цитокинов с основными программами, обеспечивающими выживание нормальных и опухолевых клеток, рассматриваются перспективы использования цитокинов для подавления опухолевого роста.

В очерке 3 подробно рассмотрены основные факторы, определяющие резистентность опухолевых клеток к химиотерапии, и проанализированы возможные пути преодоления лекарственной резистентности.

В очерке 4 рассматриваются новые направления противоопухолевой терапии, основанные на современных представлениях о биологических особенностях опухолевого роста. В очерк входят следующие разделы: опухолевый неоангиогенез и способы его коррекции; противоопухолевые дендритические вакцины; кинетическая тактика противоопухолевой терапии; роль теломера и теломеразы в канцерогенезе и новых направлениях противоопухолевого лечения.

Монография иллюстрирована 22 оригинальными рисунками, содержит 17 таблиц, библиография включает в себя более 400 использованных автором источников литературы.

Рецензент - Академик РАЕН, доктор медицинских наук, профессор А.Г.Румянцев.

Научный редактор - кандидат медицинских наук, доцент В.М.Чернов

Владимирская Е.Б., заслуженный деятель науки России, доктор медицинских наук, профессор. Руководитель отдела молекулярной биологии НИИ детской гематологии МЗ РФ, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФУВ РГМУ

© Владимирская Е.Б., 2001

© Агат-Мед, 2001

Дурацкие идеи, неправомерные ожидания, спекуляции — единственно возможные пути познания природы. Те из нас, которые боятся подвергать свои идеи осмеянию, не могут быть настоящими участниками в азартной игре, называемой наукой.

Карл Раймунд Поппер, философ науки

Вступление

30 лет назад знаменитый французский гематолог Жан Бернар, говоря о перспективах лечения острого лейкоза, сказал, что лейкоэмическая опухоль живет по законам мафии, не подчиняясь никаким «социальным» связям и контролирующим механизмам. Как утверждал Жан Бернар, рассчитывать на успех дифференцирующей терапии так же бесперспективно, как превратить членов мафии в полезных для общества граждан путем их перевоспитания, единственный путь борьбы с ней - полное уничтожение.

Жизнь подтвердила правоту французского ученого и касается это всех видов злокачественных опухолей. Неоднократные попытки дифференцирующей терапии себя не оправдали и не явились альтернативой цитотоксического воздействия.

Основным направлением противоопухолевой терапии остается уничтожение опухолевой массы. При этом оптимальной реализацией терапевтического и радиологического воздействия на опухоль является включение программы апоптоза в опухолевых клетках.

Развитие молекулярно-генетических исследований в последние 10-15 лет открыли новые внутриклеточные взаимодействия и связи опухолевых клеток с микроокружением, иммунной и сосудистой системами, с нормальными тканями.

Огромный поток информации открывает новые, иногда неожиданные возможности воздействия на опухолевую ткань, однако, их правильное понимание и развитие требуют концептуального анализа.

Предлагаемая монография является попыткой такого осмысления. Автор не претендует на исчерпывающее освещение всех особенностей биологии опухолевой клетки, лежащих в основе опухолевого роста и определяющих оптимальные терапевтические подходы. В монографии рассмотрены те внутриклеточные механизмы опухолевых клеток и пути воздействия на них, которые, по мнению автора, лучше разработаны и ближе подошли к возможности их практического использования для оптимизации противоопухолевой терапии. С этим связана и форма изложения в виде очерков, в которых материал литературы проанализирован с личных/ концептуальных позиций автора.

4 ♦ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Каждый очерк представляет собой законченный анализ определенных проблем, связанных с разработкой новых направлений противоопухолевой терапии и совершенствованием уже имеющихся. Завершается каждый очерк указателем литературы, представляющим работы, явившиеся источником анализируемой информации.

Монография предназначена широкому кругу врачей и научных сотрудников, занимающихся проблемами противоопухолевой терапии.

Автор

О Ч Е Р К 1

Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста



Клеточная продукция нормального кроветворения велика. Многочисленные расчеты ^[1,2] показывают: у мужчины массой тела 70 кг в сутки образуется 1×10^{11} лейкоцитов и 2×10^{11} эритроцитов, что составляет клеточную массу соответственно 100 и 200 грамм (в сумме 300 грамм). Таким образом, в организме взрослого мужчины в месяц образуется 9 кг клеток крови, в год около 100 кг, а за 70 лет жизни - порядка 7 тонн клеток. Клеточное равновесие в столь продуктивной клеточной системе, каковой является нормальное кроветворение, поддерживается основным законом клеточной кинетики: в единицу времени рождается и умирает одно и то же количество клеток.

Закономерности рождения клеток крови, т.е. клеточной пролиферации, ее механизмы на клеточном, биохимическом, молекулярно-генетическом уровнях, регуляция этих процессов хорошо изучены и нашли свое окончательное концептуальное оформление в молекулярно-биологических исследованиях последних 15 лет ^[3,4]. Однако в последнее десятилетие биологам стало ясно, что механизм и регуляция клеточной смерти - процессы столь же сложные, но значительно менее изученные ^[5]. Оказалось, что все клетки многоклеточного организма и некоторые одноклеточные несут в себе генетически детерминированную программу самоубийства ^[6,7]. При активации ее наступает клеточная смерть характерной формы, называемая апоптозом ^[8,9,10,11]. Термин "апоптоз" для обозначения

“запрограммированной клеточной смерти” предложил в 1972 году J.F.Kerr^[9] (по-гречески, апо - полное, ptosis - падение, утрата) , заимствовав его у Гиппократ, назвавшего так “осенний листопад” [цит. по 12.].

Апоптоз может быть включен множеством внутренних и внешних сигналов [13,14,15,16] и направлен на освобождение от старых или поработанных в избытке клеток, а также от клеток с нарушениями дифференцировки и повреждением генетического вещества, в том числе и при вирусном заражении. Морфологические признаки апоптоза хорошо известны [17], являются следствием контролируемого самопериваривания, представлены сморщиванием клетки, конденсацией и фрагмента-



Рис. 1.1. Морфология апоптоза

цией ядра, разрушением цитоскелета и буллезным выпячиванием клеточной мембраны (см.рис. 1.1).

Особенностью апоптоза является то, что умирающая клетка сохраняет целостность своей мембраны до полного завершения процесса и только тогда разрушение ее оболочки является сигналом для расположенных вблизи фагоцитов к поглощению оставшихся фрагментов и завершению процесса клеточной деградаци [18,19,20]. Апоптотические клетки, не подвергшиеся немедленному фагоцитозу, превращаются в мелкие связанные с мембраной фрагменты, называемые “апоптотическими телами”. Важной чертой апоптоза является то, что удаление умирающих клеток происходит без развития воспаления. В отличие от апоптоза, некроз представляет собой патологическую форму смерти клеток в результате их острого повреждения, разрыва оболочки, высвобождения содержимого цитоплазмы и индукции воспалительного процесса [8,9].

Работы, посвященные апоптозу, растут в последние годы с лавинообразной быстротой, исчисляются тысячами, что свидетельствует о фундаментальном биологическом значении этого процесса. Попробуем суммировать основные сведения о механизмах апоптоза.

1.1 Механизмы апоптотической смерти клеток

Пути реализации программы апоптоза разнообразны, зависят как от индивидуальных особенностей клеток, так и от характера и степени выраженности внешних и внутренних воздействий, вызывающих ее включение.

Многое в механизмах осуществления апоптоза остается неясным, сигнальные пути передачи апоптотического сигнала переплетаются с сигнальными путями других программ жизнедеятельности клеток, создавая сложную картину внутри- и межклеточных взаимодействий, лежащих в основе регуляции и саморегуляции клеточного роста и дифференцировки.

Однако некоторые механизмы апоптоза достаточно изучены, их обсуждение существенно для понимания многих вопросов регуляции кроветворения и иммуногенеза человека.

Процесс апоптоза может быть разделен на 2 фазы:

- Формирование и проведение апоптотических сигналов — фаза принятия решения;
- Демонтаж клеточных структур — эффекторная фаза.

Рассмотрение цепочки апоптотических событий удобнее начать с завершающей стадии апоптоза.

Основными фигурантами эффекторной фазы апоптоза являются цистеиновые протеазы (каспазы). Каспазы расщепляют белки, являющиеся мишенями для их действия, характерным для апоптоза образом - в местах расположения аспарагиновых оснований [21]. К настоящему времени у человека идентифицировано 14 видов каспаз, которые по своим функциональным особенностям могут быть разделены на 3 группы:

8 ♦ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

- Активаторы цитокинов (каспазы 1,4,5,13)
- Индукторы активации эффекторных каспаз (каспазы 2,8,9,10)
- Эффекторные каспазы - исполнители апоптоза (каспазы 3,6,7).

Каспазы находятся в клетках в неактивном состоянии (прокаспазы). Активация каспаз происходит путем их протеолитического расщепления в местах расположения аспарагиновых оснований, с последующей димеризацией образованных таким образом активных субъединиц (см.рис.1.2). Этот процесс может происходить путем аутоstimуляции при сближении двух прокаспаз, а также в результате на-

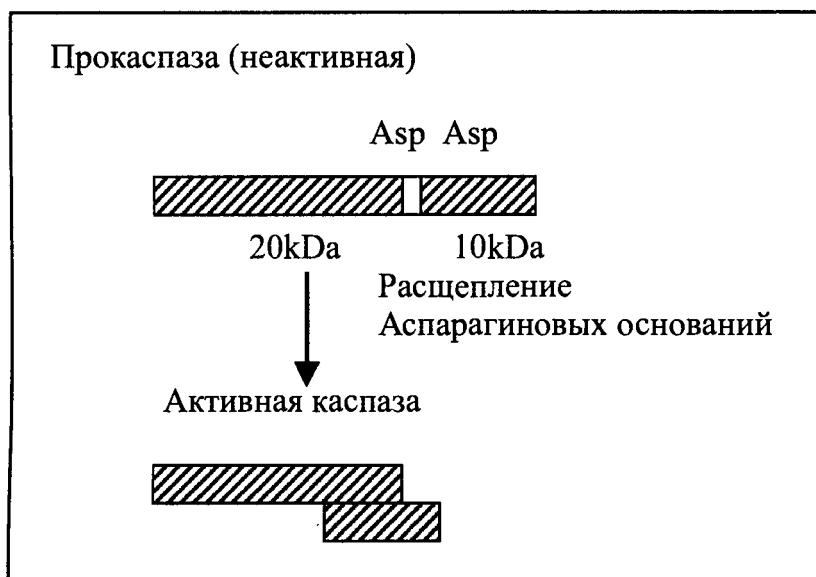


Рис. 1.2. Структура и активация каспаз. Asp- аспарагиновые основания, на уровне которых происходит протеолитическое расщепление прокаспазы с образованием активных субъединиц. Пептидные последовательности, ответственные за активацию каспаз, выделены штриховкой. Объяснения в тексте

правленного действия других протеаз и специальных адаптерных белков в процессе проведения апоптотических сигналов.

Эффекторные каспазы, будучи активированными, начинают цепь протеолитических событий, целью которых является апоптотический «демонтаж» клетки. При этом мишенями для действия эффекторных каспаз являются белки, отвечающие за различные жизненные функции клетки. Схематично, как это представлено на рис 1.3., можно выделить несколько направлений разрушительного действия каспаз:

(А) Инактивация ингибиторов тех белков, которые должны вызывать апоптотические изменения. Так, например, *нуклеаза*, вызывающая фрагментацию ДНК (CAD-каспаз активированная ДНКаза), обычно находится в неактивном состоянии,

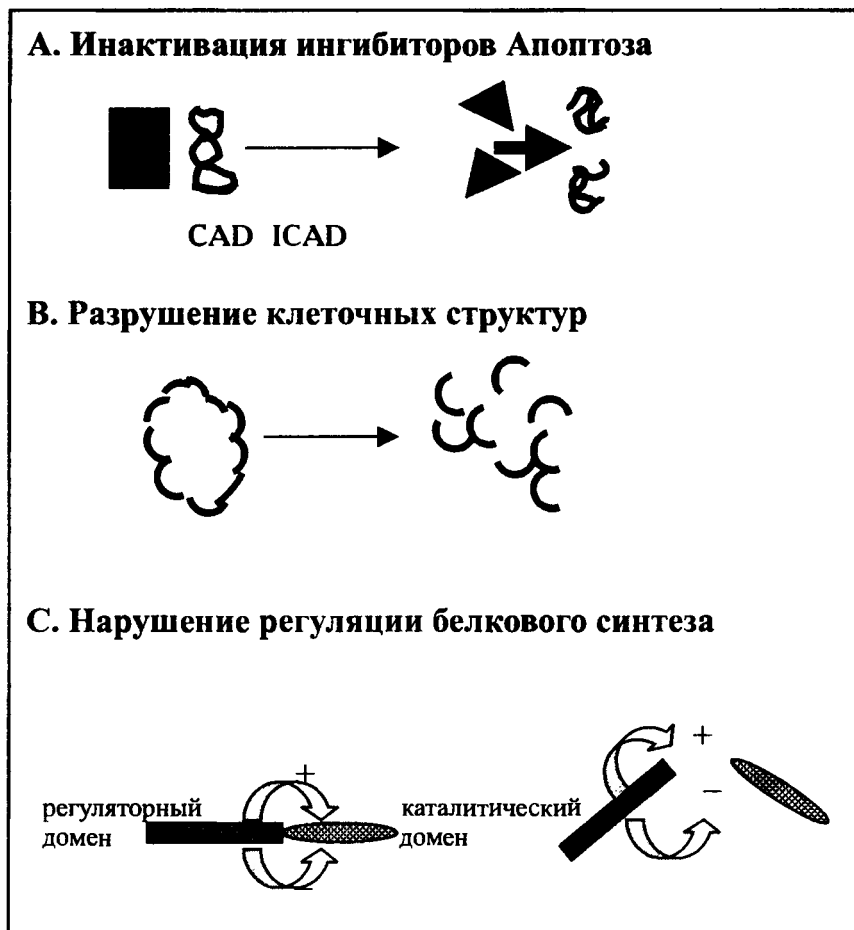


Рис. 1.3. Направления деструктивного действия эффекторных каспаз.

А. Инактивация ингибиторов протеинов, расщепляющих основные клеточные субстраты. Например, CAD/ICAD (см. текст)

В. Разрушение клеточных структур, например, ядерной оболочки.

С. Нарушение функции регуляторных белков

в соединении с белком-ингибитором (ICAD). Активированные каспазы 3 и 7 разрушают этот белок, запуская действие ДНКазы ^[22,23].

(В) Прямое расщепление структурных белков клетки. Например, активированная каспаза 6 расщепляет ядерный ламин — белок, жестко связанный с ядерной мембраной и организующий структуру хроматина. Разрушение ламина приводит к конденсации хроматина ^[24,25].

(С) Каспазы организуют также и нарушение регуляции белкового синтеза. Следствием этого может быть не прямое разрушение цитоскелета через расщепление бел-

ков, регулирующих их структуру. Так, эффекторные каспазы расщепляют *гелсолин*, регулирующий натяжение нитей актина, что приводит к его разрушению [26].

Активированные каспазы могут вызвать также инактивацию и дезрегуляцию белков, вовлеченных в репарацию ДНК (например, DNA-PK_{cs}), образование мРНК (например, U1-70K), репликацию ДНК (например, *репликационный фактор C*) [27,28].

Таким образом, участие эффекторных каспаз в апоптозе напоминает хорошо спланированную военную акцию, направленную на уничтожение: разрыв связей с окружающими клетками; реорганизация цитоскелета; снижение возможностей репарации и репликации ДНК; разрыв ядерной мембраны и разрушение ДНК; выброс сигналов, маркирующих клетку для апоптоза; расчленение клетки на апоптотические тельца. Неслучайно эффекторные каспазы получили название «каспаз-палачей».

К ингибиторам эффекторных каспаз относятся белки семьи IAP, подавляющие активность каспаз 3 и 9. Интересно, что один из этих белков — Survin- обнаружен в опухолевых клетках большинства раков [29]. С ним связывают резистентность опухолевых клеток к химиотерапии.

Исходя из решающей роли каспаз в осуществлении клеточной смерти этого типа, апоптоз, с биохимической точки зрения можно рассматривать как клеточную смерть, индуцированную каспазами [30].

Справедливости ради следует отметить, что каспазы, являясь основными эффекторами апоптоза, все же до конца не монополизируют эту клеточную активность. В ряде клеточных систем апоптоз может происходить и при инактивации каспаз, за счет активности других эффекторов, таких, как активированные кальцием протеазы (например, кальпейн при индуцированном апоптозе лейкемических клеток), сериновые и лизосомальные протеазы, эндонуклеазы [31]. Однако значение этих эффекторов в реализации апоптоза невелико и носит чаще всего дополнительный, компенсаторный характер.

1.2. Сигнальные пути апоптоза

Основная задача системы, регулирующей апоптоз, - держать эффекторные каспазы, демонтирующие клетки, в неактивном состоянии, но быстро переводить их в активную форму в ответ на минимальное действие соответствующих индукторов.

Функцию активации эффекторных каспаз берут на себя каспазы-индукторы, основными представителями которых являются *каспаза 8* и *каспаза 9*.

Эти каспазы при обычном состоянии клетки неактивны, существуют в форме про-каспаз. Отсюда действие разнообразных проапоптотических сигналов направлено на активацию каспазы 8 и каспазы 9. В соответствии с этим выделяют 2 типа ведущих сигнальных путей:

1) Повреждение ДНК, радиация, действие токсических агентов, действие глюкокортикоидов, прекращение цитокиновой регуляции, укорочение до критического

уровня теломеров - активация каспазы 9;

2) Проапоптотические сигналы, возникающие при активации рецепторов «региона клеточной смерти» (например, Fas-R, TNF-R)- активация каспазы 8.

Рассмотрим последовательно каждый из этих путей, схематично представленных на рис. 1.4.

Сигнальные пути активации каспазы 9

Сенсором повреждения ДНК и нарушений в клеточном цикле является ген P53.

P53-ген

Ген P53, располагающийся на коротком плече хромосомы 17, кодирует образование ядерного белка, состоящего из 393 аминокислот, с молекулярной массой 53 Kd. Тетрамер P53 функционирует как транскрипционный фактор, связываясь своим карбоксильным окончанием со специфическими регионами генов-мишеней^[32]. Белок P53 находится в цитоплазме в латентном состоянии. В последние годы показано, что активация его происходит не только в ответ на поражение ДНК, но также может явиться и следствием многих других процессов, происходящих в клетке, в том числе активации онкогенов, гипоксии, дефиците питания, старении и других^[33]. Недаром этот ген получил у одних авторов название «Господин ночной сторож»^[34], а у других — «Хранитель генома»^[35].

При активации P53 белок способен инициировать независимо друг от друга 2 программы:

- Временную остановку клеточного цикла в G1/S фазе с помощью белка p21^{WAF1}, ингибирующего циклин-зависимые киназы^[36]
- Стимуляцию апоптоза путем активации гена Вах — проапоптотического гена семьи Bcl-2 и/или активации образования свободных форм кислорода, способствующих выходу цитохрома-С из митохондрий.^[37]

Появившиеся в последние годы экспериментальные данные с выключением генов позволяют предположить, что приоритетной для большинства клеток является программа временной остановки митотического цикла. Есть сведения и об участии P53 в процессах репарации ДНК путем активации вновь открытого гена P53R2, кодирующего рибонуклеотид редуктазу^[38]. Программа апоптоза включается при невозможности клеткой репарировать ДНК во время «ареста» при прохождении митотического цикла и/или дефиците белка p21^{WAF1}^[33]. В некоторых клетках генетически обусловлен приоритет программы апоптоза при активации P53 гена.

Роль P53 — тканезависимая. У мышей в эксперименте с выключением этого гена радиация не вызывала апоптоза в лимфоцитах, но в легочной ткани признаки апоптоза были ярко выражены^[39].

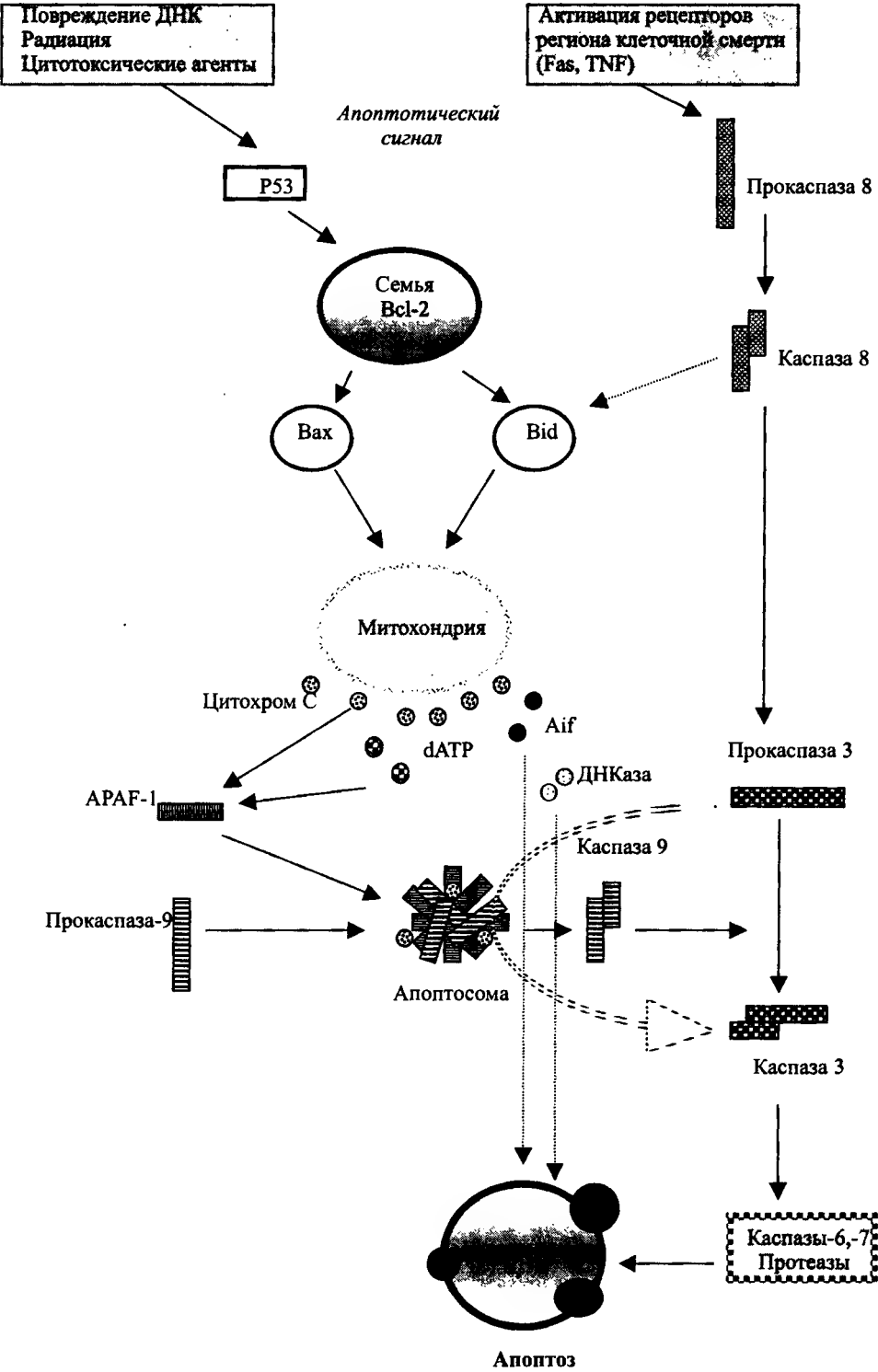


Рис. 1.4. Основные пути апоптоза.

Bax, Bid – проапоптотические гены семьи Bcl-2. dATP – аденозин-трифосфорная кислота. ARAF-1 – апоптотический протеаз-активирующий фактор.

- ⊗ – цитохром С.
- ⊕ – dATP – аденозин-трифосфорная кислота.
- – Aif – апоптоз-индуцирующий фактор.
- ⊙ – ДНКаза.
- ➔ – обязательный путь активации.
- ➔ – дополнительный путь активации.

На рисунке представлены основные пути апоптоза, реализующие проапоптотические сигналы двух основных типов: повреждение ДНК радиацией или цитотоксическими агентами) и активация рецепторов «региона клеточной смерти».

Повреждение ДНК вызывает активацию гена P53. Дальнейшее прохождение апоптотического сигнала этого типа происходит через активацию проапоптотических генов семьи Bcl-2 (Bax и Bid). Белки этих генов вызывают пермеабиллизацию мембраны митохондрий и выход в цитозоль Цитохрома С, аденозин-трифосфорной кислоты (dATP), апоптоз индуцирующего фактора (Aif) и ДНКазы. Цитохром С вместе с dATP активирует находящийся в цитозоле белок ARAF-1, образуя апоптосому, в которой происходит активация каспазы-9. Последняя активирует каспазу-3 – основной «эксзеkjютор» каспазного каскада. Вслед за этим активируются другие каспазы, протеазы и ДНК-азы, происходит апоптоз. Высвобожденные из митохондрий Aif и ДНКаза выполняют дополнительный внекаспазный путь апоптоза, реализуют свою активность непосредственно в ядре.

Связывание рецепторов «региона клеточной смерти» с соответствующими лигандами приводит к активации каспазы 8, способной к независимой активации каспазы 3. На этом пути может происходить и дополнительное вовлечение семьи Bcl-2 генов путем активации каспазой 8 белков гена Bid. Более подробные объяснения в тексте

И все-таки основной функцией гена P53 следует считать включение программы апоптоза при повреждении клеточного генома, что можно рассматривать как защитную реакцию организма от накопления генетически дефектных клеток. Снижение активности гена P53 или мутация в нем, приводящая к потере способности к включению апоптоза, является серьезным фактором, предрасполагающим к возникновению опухолей и развитию резистентности к химиотерапии.

Мутация гена P53 обнаруживается более чем в половине раковых опухолей, частота ее повышается при длительной химиотерапии ^[37]. У детей мутация в гене P53 чаще наблюдается при Т-ОЛЛ, составляя около 12% ^[38] и всегда является прогностически неблагоприятным фактором ^[39].

Итак, ген Р53 необходим для реализации программы апоптоза при повреждении ДНК и токсических воздействиях на клетку. Как это видно на схеме (рис.4), следующим шагом в проведении проапоптотического сигнала по этому пути является включение семьи Bcl-2 —генов.

Семья Bcl-2-генов

Интерес к апоптозу резко возрос в середине 80-х годов, когда было выявлено [40,41], что усиление активности онкогена Bcl-2, являющееся следствием обычной для В-клеточной фолликулярной лимфомы человека транслокации t (14;18), приводит к образованию опухолевого клона не за счет усиления пролиферации, а вследствие повышения выживаемости опухолевых клеток. Позднее было показано, что при этой транслокации онкоген Bcl-2, изначально располагавшийся на хромосомном сегменте 18q21, сливается с локусом, кодирующим тяжелую цепь Ig на хромосоме 14q32, что приводит к его повышенной экспрессии [42]. Молекулярно-генетические исследования последующего десятилетия показали, что в, так называемую, семью Bcl-2 генов, картированных у человека на 18 хромосоме, входят и другие гены, экспрессирующие белки с противоположной функцией (см.табл.1.1).

Табл. 1.1. Состав семьи Bcl-2 генов

<i>Антиапоптотические гены</i>	<i>Проапоптотические гены</i>
****Bcl-2 [#]	***Bax [#]
****Bcl-x _L [#]	***Bak [#]
****Bcl-w [#]	***Bok/Mtd [#]
****Boo [#]	**Bcl-x _S [#]
***Al	*Bad
***Mcl-1 [#]	*Bik/Nbk [#]
	*Bid
	*Hrk/DP5 [#]
	*Blk [#]
	*Bim/Bod [#]

* обозначает число консервативных последовательностей, известных как регионы, гомологичные Bcl-2.

**** - 4 региона (ВН1-ВН4); *** -3 региона (ВН1-ВН3); ** - 2 региона (ВН3, ВН4); * -1 регион (ВН3);

[#] - СООН -концевой гидрофобный домен, ответственный за прикрепление белков к наружной пластинке митохондриальной мембраны.

В настоящее время клонировано 16 генов, составляющих эту семью. Белки, производные этих генов, объединяет схожий морфологический состав — каждый из них имеет хотя бы одну из 4-х консервативных аминокислотных последовательностей, характерных для Bcl-2-гена. Эти последовательности известны как регионы, гомологичные Bcl-2 (ВН1-ВН4). Функциональное значение этих регионов до конца неясно, но по мнению некоторых исследователей ^[43], именно они обеспечивают реактивные способности белкам этой семьи.

Как следует из представленных в табл.1.1. данных, только 6 из них оказывают, подобно основателю этой семьи- Bcl-2 гену, антиапоптотическое действие: защищают клетки от широкого спектра физиологических и экспериментальных воздействий, направленных на индукцию апоптоза. К таким стимулам относятся повреждение ДНК, действие глюкокортикоидов, прекращение цитокиновой регуляции и др. Некоторые из белков этой группы имеют СООН- концевой гидрофобный регион, ответственный за прикрепление белков к наружной поверхности митохондриальной мембраны.

Остальные 10 членов семьи- Bcl-2 вызывают апоптоз. Эти проапоптотические белки могут быть подразделены на 2 подгруппы в зависимости от числа ВН регионов, которыми они располагают. Первые 4 (см.табл.1.1.) имеют по 2- 3 ВН-региона, в то время как у 6 остальных обнаруживается только один ВН3-регион. Именно с этим регионом связывают проапоптотическую функцию белков ^[44]. Многие из проапоптотических белков также, как антиапоптотические белки этой семьи, имеют концевой гидрофобный домен, но в отличие от последних, не прикрепляются к митохондрии до получения проапоптотического сигнала ^[45].

Восприятие анти- или проапоптотических сигналов членами семьи Bcl-2 происходит как на уровне генов (так, белок Р53 повышает экспрессию гена Вах) так и на уровне посттранскрипционных белков (действие цитокинов). При этом между самими белками наблюдаются сложные взаимодействия иногда в антагонистической манере ^[46]. В процессе этих взаимодействий про- и антиапоптотические протеины могут образовывать гомо- и гетеродимеры как внутри своей группы, так и с протеинами противоположной направленности действия (см.рис. 1.5). Некоторые связи между промоторами и супрессорами клеточной смерти высоко специфичны (например, Bcl-2 и Bcl-1), другие скорее случайны. Значение этих взаимодействий пока прояснено только в отношении проапоптотических белков, имеющих один ВН3 домен. Эти белки способны реализовать свою проапоптотическую активность только в антагонистической манере, образуя гетеродимеры с антиапоптотическими белками семьи Bcl-2 ^[44]. Это правило не распространяется на всех членов семьи; Bcl-x_L, например, для выражения своей антиапоптотической активности не требует связи с промотором клеточной смерти ^[43].

В результате многочисленных экспериментов к настоящему времени сложилось впечатление, что решение жить или умереть клетке принимается на уровне семьи

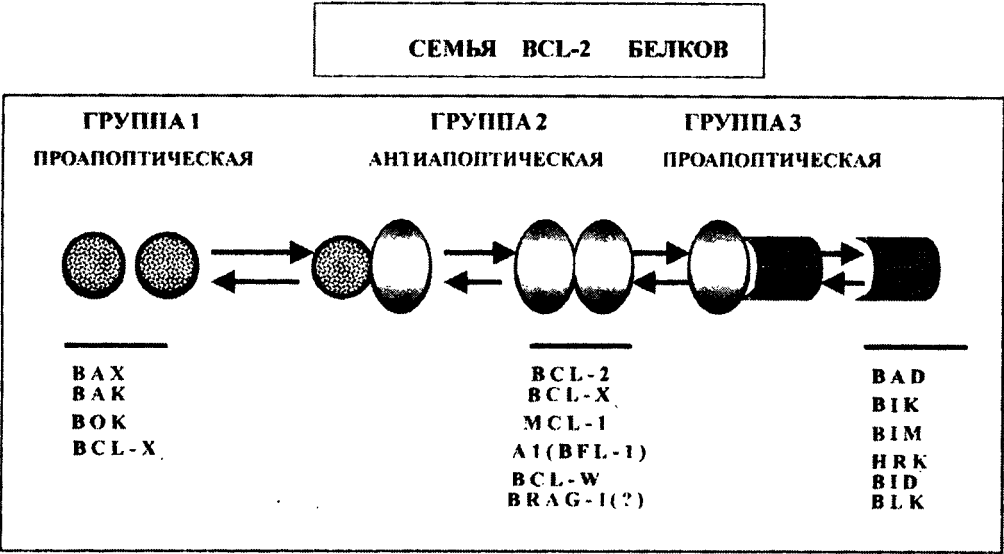


Рис. 1.5. Способы взаимодействий между белками семьи Bcl-2.
Объяснения в тексте

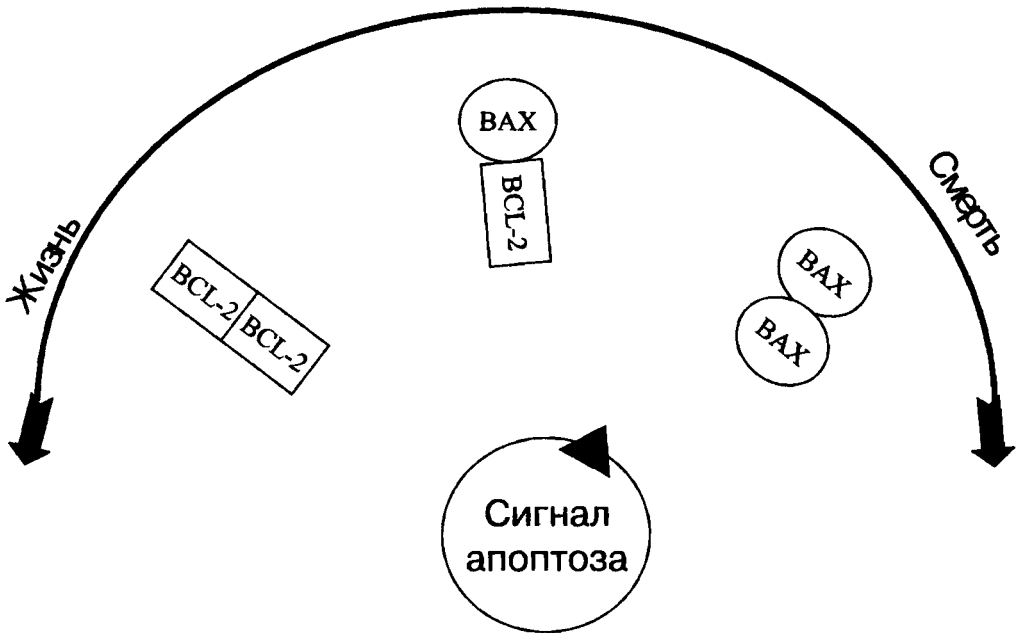


Рис. 1.6. Предрасположенность к апоптозу. Отношение числа гомодимеров к гетеродимерам определяет предрасположенность к апоптозу

Bcl-2 на основании относительного преобладания активных супрессоров или промоторов апоптоза. Это положение схематично проиллюстрировано на рис. 1.6.

Как же происходит реализация этого решения, что необходимо для дальнейшего продвижения по сигнальному пути, конечным пунктом которого должна стать активация индукторной каспазы 9?

Про- и антиапоптотическое действие активированных белков семьи Bcl-2 реализуется главным образом через модуляцию активности митохондрий.

РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В ПРОЦЕССАХ АПОПТОТИЧЕСКОЙ СМЕРТИ КЛЕТОК

Митохондрия — матрикс, образованный клеточными органеллами и окруженный двухслойной мембраной ^[47]. Митохондрия содержит геном, способный кодировать ограниченное число РНК и белков, необходимых для ее функции, однако, большинство же компонентов митохондрии кодируются в ядре, а затем импортируются в нее. Роль митохондрий в поддержании жизни велика — они являются основным источником клеточной энергии, образуя АТФ из АДФ с помощью окислительного фосфорилирования. В то же время многие исследователи ^[48] считают митохондрии ключевой фигурой апоптоза. Это связано с тем, что митохондрии являются источником цитохрома С, АТФ, Ca^{++} , Аиф (апоптоз индуцирующий фактор) — компонентов, необходимых для дальнейшего продвижения апоптотического сигнала. Выход этих факторов из митохондрии осуществляется только при взаимодействии ее мембраны с активированными белками семьи Bcl-2. Многое в этом процессе требует уточнения, однако, схематически его можно представить следующим образом. Активированные белки семьи Bcl-2 своими COOH — гидрофобными основаниями, как якорями прикрепляются к наружной мембране митохондрий. Происходит это в местах сближения наружной и внутренней мембран, где, по-видимому, физиологически существуют пермеабилизационные поры, называемые мегаканалами, с диаметром, не превышающим 2nm. Эти поры функционируют как сенсоры многих физиологических параметров и таким образом передают информацию об основных метаболических процессах, происходящих в клетке. Они являются каналами для Ca^{2+} , вольтажа, pH , активных форм O_2 , но не пропускают некоторые анионы и непроницаемы для более крупных молекул Цитохрома С, АТФ и Аиф, необходимых для апоптоза. Было показано, что проапоптотические белки семьи Bcl-2 (Bax, Bad, Bak и др.), укоренившись в наружной мембране, вступают в соединение с ANT (adenin-nucleotid-translocator), встроенным во внутреннюю мембрану в этих локусах, образуя временно более крупные мегаканалы (диаметр 2,4-3 nm). По этим каналам в цитозоль клетки поступают Цитохром С, АТФ и Аиф. Антиапоптотические белки семьи Bcl-2 не способны пермеабиллизировать мембрану митохондрий, а по некоторым данным ^[49], напротив, закрывают уже существующие каналы, прерывая таким образом продвижение проапоптотического сигнала и защищая клетку от апоптоза. Каково назначение проапоптотических митохондриальных сигнальных молекул?

Цитохром-С — белок с молекулярной массой 15 kDa, кодируется ядерным геном, синтезируется как апо-цитохром С, импортируется в митохондрию, где прикрепляется к внутренней поверхности мембраны и выходит в цитозоль через мегаканалы, открытые для него проапоптотическими белками семьи Bcl-2 (Bax, Bad, Bak и др.)^[50]. Цитохром-С необходим для образования апоптосомы, где и происходит активация каспазы 9, которая затем, в свою очередь, активирует основную «киллерную» каспазу 3 (см. рис. 1.4). Так завершается сигнальный путь апоптоза, вызванный повреждением ДНК.

Апоптосома представляет собою комплекс *АРАФ-1* (apoptotic protease activating factor), Цитохрома-С, каспазы-9 и АТФ^[51]. До соединения с Цитохромом С АРАФ-1 существует в цитозоле в неактивном состоянии. При отсутствии достаточного количества АТФ образование апоптосомы не происходит и гибель клетки идет по некротическому пути.

Вместе с Цитохромом-С и АТФ из митохондрий в цитозоль клетки выходит также **АИФ** (апоптоз индуцирующий фактор). Синтез этого фактора также кодируется ядерным геном, превращение в зрелую форму (белок с молекулярной массой 75 kDa) происходит в митохондриях^[52]. Выйдя из митохондрии, АИФ направляется в ядро клетки, где вызывает фрагментацию ДНК, напоминающую апоптоз. Оверэкспрессия Bcl-2 препятствует выходу АИФ из митохондрий, но не его активности при введении АИФ в клетку в эксперименте. АИФ не требует цитозолевого активации, выделяется из митохондрии до Цитохрома-С и, возможно, способствует его выходу. Таким образом, АИФ является самостоятельным «киллерным» фактором, дублирует действие Цитохрома-С и каспаз при их блокировании.

Интересно, что в процессе апоптоза митохондрия не теряет своей целостности и не подвергается разрушению.

Перечисленные здесь события легли в основу гипотезы, по которой митохондрия представляется ключевой фигурой апоптоза^[48]. Однако существует и альтернативная гипотеза^[21], считающая основным мотором апоптоза каскадную активацию каспаз, при этом высвобожденный из митохондрий Цитохром С является не инициатором, а лишь усилителем апоптотического каскада. Последние представления поддерживаются данными о том, что активность семьи Bcl-2 может поддерживаться и без участия митохондрий. Показано, что антиапоптотические белки этой семьи могут образовывать в цитозоле комплекс с АРАФ-1, блокирующий его активность. Ингибция этой связи проапоптотическими членами семьи Bcl-2 высвобождает АРАФ-1 и разрешает ему активировать каспазу 9^[53]

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ АКТИВАЦИИ КАСПАЗЫ 8

Передача проапоптотического сигнала при связи лиганда с рецепторами региона клеточной смерти происходит посредством адапторных белков FADD/MORT1,

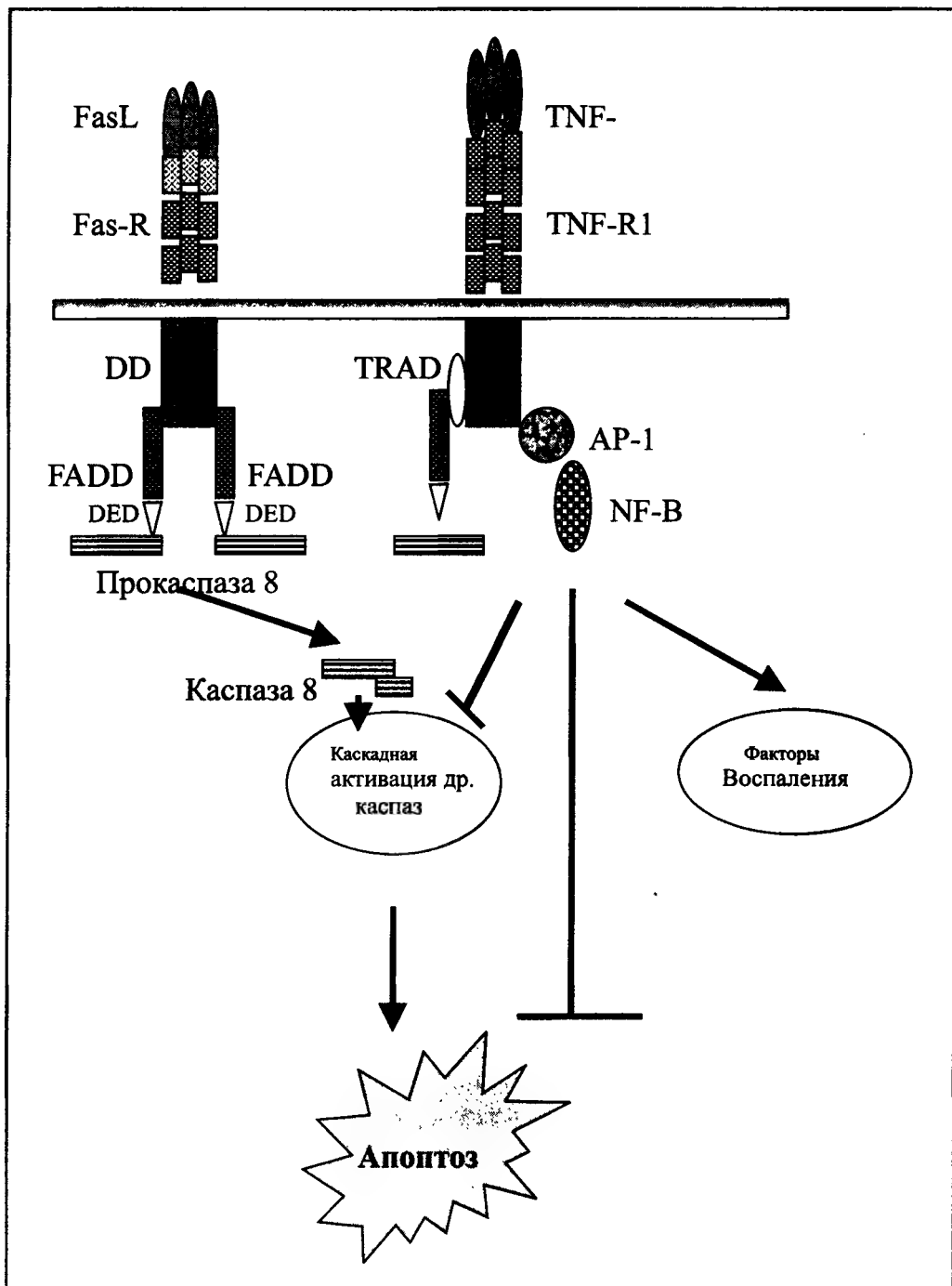


Рис. 1.7. Апоптоз, индуцированный сигналом «региона клеточной смерти»

Рис. 1.7. Апоптоз, индуцированный сигналом «региона клеточной смерти».

FADD-fas-associated death domain (связанный с FAS регион клеточной смерти)

TRADD – TNF-R-associated death domain (связанный с TNF-R регион клеточной смерти)

DD – death domain (регион смерти)

DED – death effector domain (регион исполнителя смерти)

NF- κ B, AP-1 – транскрипционные факторы, активирующие провоспалительные и иммуномодуляторные гены

Показан путь апоптоза, связанный с включением рецепторов региона клеточной смерти. Активация рецептора после его связи с лигандом происходит путем аутофосфорилирования регионов DD его сигнальной части в процессе тримеризации

чей N-терминальный регион (DED) в свою очередь связывается с аналогичным регионом прокаспазы-8, вызывая ее аутокаталитическую активацию^[54] (см.рис. 1.4 и рис. 1.7). При активации некоторых членов семьи TNF-рецепторов (в том числе, TNF-R1) используется дополнительный адапторный белок TRADD.

Рецепторный путь клеточной смерти представляется более коротким, чем апоптотический каскад, инициированный повреждением ДНК и рассмотренный выше: посредством адаптерных молекул происходит активация каспазы 8, которая в свою очередь способна напрямую активировать каспазы-палачи. Но это только основная схема, в действительности этот сигнальный путь значительно более сложный и переплетается с другими механизмами апоптоза. Так, известно, что каспаза 8 способна активировать белок Bid, что приводит, как подробно описано выше, к выбросу Цитохрома C из митохондрий. И хотя ясно, что этот путь не требует активации митохондрий, вовлечение их в процесс усиливает рецептор-индуцированный апоптоз (см.рис. 1.4).

Этот же сигнальный путь с привлечением других адаптерных белков используется и для реализации других клеточных программ. Так, сигнал, прошедший через TNF-R1, может активировать также и транскрипторные факторы NF- κ B и AP-1. Эти сигнальные молекулы вызывают активацию генов, обеспечивающих продукцию факторов воспаления^[55]. Таким образом при активации TNF-R клетка должна принять решение — совершить ли самоубийство или выжить для продукции провоспалительных цитокинов^[56]. Последнее решение принимается лимфоцитами чаще, возможно, потому что транскрипционный фактор NF- κ B тормозит апоптотические пути^[57]. На выбор клетки влияет, по-видимому, и клеточное сообщество. Этот пример подтверждает то, что одни и те же сигнальные пути используются для реализации различных клеточных программ, механизмы выбора и принятия решения остаются во многом неясными. Так, рецепторный путь клеточной смерти у лимфоцитов независим от семьи Bcl-2-генов и не может быть подавлен их антиапоптотической активностью^[58-60].

Активация же Р53 может приводить в некоторых клеточных системах к трансактивации генов, кодирующих рецепторы региона «клеточной смерти» [61].

Таким образом, существуют различные, часто перекрещивающиеся пути и механизмы реализации апоптотической программы, зависящие от клеточного типа и специфики проапоптотического сигнала. Разнообразие и многовариантность сигнальных путей апоптоза обеспечивают клетке запасные возможности для осуществления столь важной для клетки программы и в то же время делают эту программу очень зависимой от множества внешних и внутренних воздействий.

1.3. Модель апоптоза

Многое в регуляции апоптоза и в путях его реализации остается неясным.

При наличии столь сложных и консервативных путей генетической регуляции апоптоза, он может происходить в клетках, лишенных ядра [40], в условиях ареста белкового синтеза [41], а также и в изолированных ядрах, находящихся вне клеток [42]. Клетки могут подвергаться апоптозу в любой стадии клеточного цикла, при этом чувствительность их к апоптотическим стимулам различна [62].

Эти данные заставляют предположить, что отдельные компартменты клетки автономны в отношении апоптоза, а эффекторы его конституционально экспрессированы в каждой клетке, при этом контроль за их активностью может осуществляться как с помощью внутри-, так и внеклеточных сигналов [63].

Все это привело к созданию **модели апоптоза** [6,64], по которой каждая клетка при своем рождении как бы запрограммирована на самоуничтожение, условием жизни ее является блокирование этой суицидальной программы, осуществляемое постоянно или с небольшими интервалами.

К наиболее серьезным физиологическим ингибиторам апоптоза относятся ростовые факторы, экстрацеллюлярный матрикс, CD40-лиганд, нейтральные аминокислоты, цинк, эстрогены, андрогены [65]. Механизм их действия неясен, его возможными путями могут быть снижение концентрации эффекторов апоптоза или снижение их активности до безвредного уровня, активация антиапоптотических факторов (например, Bcl-2 гена) [66]. С этих позиций становится понятным особое значение связей клеток с экстрацеллюлярным матриксом, столь важное для функционирования нормального кроветворения.

Дифференцировка в нормальном кроветворении, является стохастическим процессом [67], т.е. стволовые кроветворные клетки и клетки-предшественники осуществляют заложенную в их геном дифференцировочную программу автоматически при единственном условии - выживании, для чего необходимо воздействие на них антиапоптотических факторов. Самыми мощными антиапоптотическими стимулами для нормального кроветворения являются ростовые факторы. Ростовые факторы, наиболее активно уча-

Таблица 1.2. Цитокины и апоптоз.

Цитокины	Способ воздействия на апоптоз	Клеточные мишени
SF	предотвращает апоптоз	стволовые кроветворные клетки
TPO	предотвращает апоптоз	стволовые клетки, предшественники мегакариоцитов, мегакариоциты, тромбоциты
EPO	предотвращает апоптоз	стволовые клетки, эритроидные предшественники, эритрокариоциты, эритроциты
GM-CSF	предотвращает апоптоз	ранние предшественники гранулоцитов/ макрофагов, зрелые гранулоциты
G-CSF	предотвращает апоптоз	предшественники гранулоцитов, зрелые гранулоциты
M-CSF	предотвращает апоптоз	предшественники макрофагов, моноциты
IL-1	индуцирует апоптоз	макрофаги
IL - 2	предотвращает апоптоз	T - клеточный лейкоз взрослых
IL - 3	предотвращает апоптоз	костный мозг
IL - 4	предотвращает апоптоз индуцирует апоптоз	B - ХЛЛ, тимоциты острый лимфобластный лейкоз
IL - 10	индуцирует апоптоз предотвращает апоптоз	B - ХЛЛ B -лимфоциты зародышевых центров
α - IFN	предотвращает апоптоз индуцирует апоптоз	B - ХЛЛ Ph+ХМЛ, лимфома, миелома
γ - IFN	индуцирует апоптоз	пре - B-клетки
TGF	индуцирует апоптоз	миелоидные лейкозы
TNF	индуцирует апоптоз	макрофаги

ствующие в апоптозе клеток крови, их основные мишени и характер воздействия приведены в табл. 1.2 [68-73].

Обозначения: SF- фактор стволовых клеток, EPO- эритропоэтин, TPO- тромбопоэтин, GM-CSF- гранулоцитарно-макрофагальный колонии-стимулирующий фактор, G-CSF - граиулоцитарный колониестимулирующий фактор, M-CSF- макрофагальный колониестимулирующий фактор, IL- интерлейкины, IFN- интерферон, TGF- трансформирующий фактор роста, TNF - фактор некроза опухоли.

Как следует из данных, представленных в таблице 1.2, большинство ростовых факторов, участвующих в кроветворении, препятствует апоптозу. При этом диапазон их действия широк, не ограничивается только клетками-предшественниками и пролиферирующими костномозговыми элементами, но простирается и на зрелые элементы, своим антиапоптотическим воздействием обеспечивая их выживание и нормальное функционирование (например, GM-CSF и G-CSF- факторы, необходимые для фагоцитоза нейтрофилов). Однако некоторые ростовые факторы обладают амбивалентным действием в зависимости от воспринимающих их клеток-мишеней.

Подробнее об этом см. в очерке, посвященном действию цитокинов и ростовых факторов.

Действие большинства ростовых факторов происходит через специфические рецепторы или FAS-R и реализуется через семью Bcl-2 генов, индукция апоптоза

может также происходить путем увеличения эндогенного уровня глюкокортикоидов - мощного проапоптотического фактора [74].

Снижение или повышение способности клеток к апоптозу приводит к нарушению гомеостаза и может лежать в основе развития разнообразной патологии.

Исследования последних лет показали, что патогенез многих болезней человека, в том числе рака, лейкозов, аутоиммунных болезней и вирусных инфекций связан с неспособностью клеток подвергаться апоптозу [10,11,65]. Другие болезни, такие, как нейродегенеративные расстройства, СПИД, остеоопороз, апластическая анемия и другие могут быть связаны, напротив, с повышенной способностью клеток к апоптозу [75-77]. Список заболеваний, связанных с торможением или индукцией апоптоза приведен в табл.1.3.

Таблица 1.3. Болезни, связанные с нарушением апоптоза.

Болезни, связанные с торможением апоптоза:	Болезни, связанные с усилением апоптоза:
1. Злокачественные опухоли: ● Некоторые острые лейкозы ● ХМЛ с химерным abl/bcr геном ● Фолликулярная лимфома ● Рак с мутацией гена P₅₃ ● Гормонозависимые опухоли ● Рак грудной железы ● Рак простаты ● Рак яичника 2. Аутоиммунные болезни: ● Системная красная волчанка ● Гломерулонефрит 3. Вирусные инфекции: (a) Вирусы герпеса (b) Вирус оспы (c) Аденовирусы	1. СПИД 2. Нейродегенеративные изменения: ● Болезнь Альцгеймера ● Болезнь Паркинсона ● Боковой амиотрофический склероз ● Пигментная ретинопатия ● Дегенерация мозжечка 3. Миелодиспластические синдромы 4. Апластическая анемия 5. Ишемические поражения: ● Инфаркт миокарда ● Инсульт ● Краш-синдром 6. Токсическое поражение печени: ● Алкогольный цирроз

1.4. Роль апоптоза в развитии опухолевого роста

Снижение способности к апоптозу играет существенную роль в развитии многих опухолей ^[78], осуществляется это с помощью различных механизмов, анализ которых может быть полезен для понимания существующих и поиска новых путей подавления опухолевого роста.

Наиболее хорошо изученным механизмом подавления апоптоза, лежащего в основе наработки опухолевого клона, является аутокринное и паракринное повышение экспрессии ростовых факторов и рецепторов к ним, возникающее в опухолевых клетках вследствие активации онкогенов ^[79]. Именно это свойство делает клетки опухолевого клона независимыми от микроокружения и лежит в основе их метастазирования ^[80].

Кроме того мутация онкогена нередко сопровождается извращением его функции. Типичным примером такого механизма наработки опухолевого клона является хронический миелолейкоз, при котором транслокация t(9;22), известная под названием Филадельфийской хромосомы, приводит к образованию химерного гена *abl/bcr*, продуктом которого является онкобелок, обладающий повышенной тирозинкиназной активностью и служащий важным звеном в передаче антиапоптотических сигналов в клетке ^[81,82]. Механизм антиапоптотической активности этого онкопротеина расшифрован совсем недавно ^[83]. В норме онкопротеин, кодируемый *c-abl*-геном, участвует в реализации программы апоптоза во многих клеточных системах. Онкопротеин p-210, кодируемый химерным *abl/bcr*-геном при хроническом миелолейкозе, или онкопротеин p-185, секретирующийся тем же химерным геном при остром лимфобластном лейкозе, обладают противоположной, антиапоптотической активностью — предохраняют клетки от облучения, цитотоксических препаратов и проапоптотических сигналов, возникающих при связывании FAS-рецептора. Осуществляется это путем блокирования BAX-гена и задержки выхода цитохрома-С из митохондрий.

Другой пример — мутация онкогена *c-myc*. В норме экспрессия онкогена *c-myc* выражается в усилении пролиферации и в то же время способствует аресту клетки и апоптозу при прекращении действия на нее ростовых факторов. Такой физиологический механизм направлен на ограничение накопления пролиферирующих клеток ^[84]. На модели мышинной лимфомы ^[85] и опухолево-трансформированной линии фибробластов ^[86] показано, что мутация *c-myc* в опухолевых клетках сопровождается разобщением этих функций, при этом *c-myc*-онкобелок отключает апоптоз в поврежденных пролиферирующих клетках, активируя Bcl-2 ген, либо препятствуя активации *apaf*-комплекса.

Другим механизмом поломки апоптоза в опухолевых клетках является мутация в генах, контролирующих суицидальную программу. В ряду этих процессов находится хорошо изученная оверэкспрессия Bcl-2 гена, тормозящего апоптоз, что лежит в основе развития не только В-клеточной фолликулярной лимфомы человека ^[40,41,66], но и многих других опухолей ^[65].

Онкогенная трансформация клетки часто сопровождается мутацией в Р53 гене и превращением его из индуктора в ингибитор апоптоза, что является во многих случаях ключевым механизмом в наработке опухолевого клона [87,88]. Именно этот ген должен явиться сенсором множества сигналов, возникающих при наработке опухолевого клона и призванных включить апоптоз. К ним относятся: снижение поступления ростовых факторов; потеря межклеточных взаимодействий и связей с микроокружением; гипоксия вследствие недостаточного кровоснабжения; повреждение ДНК в результате мутаций и воздействия токсинов; укорочение теломера вследствие митогенного стресса и др. Все эти факторы должны включать апоптоз через посредство Р53 гена, как это было показано ранее. При снижении его активности или в результате патологической мутации этого не происходит, что лежит в основе накопления опухолевых клеток и дальнейшей опухолевой прогрессии. Мутация в гене Р53 является также одним из факторов метастазирования опухоли, так как разрешает опухолевым клеткам длительно пребывать в суспензии без поддержки специфического микроокружения, что в норме должно было бы завершиться апоптозом.

Мало изученным, но не менее важным, как в понимании онкогенеза, так и в поисках новых путей коррекции его, является торможение апоптоза в результате нарушений его эффекторных механизмов и путей передачи проапоптотических сигналов. В этом отношении особый интерес представляет промиелоцитарный острый лейкоз. Как показали исследования последних лет [89-91], в основе развития этой опухоли лежит транслокация t(15;17), в результате которой происходит слияние РМЛ гена (хр.15) с геном рецептора ретиноевой кислоты (хр.17). В результате этого слияния образуется химерный ген РМЛ/RARa, маркирующий заболевание. Дальнейшие исследования показали, что химерный ген РМЛ/RARa бывает трех разновидностей в зависимости от того, в каком интроне РМЛ гена произошла поломка. При этом только одна из них, так называемая, длинная форма транскрипта (поломка в 6 интроне РМЛ гена) продемонстрировала высокую чувствительность к проапоптотическому действию высоких доз транс-ретиноевой кислоты [92,93]. Механизм этих событий более подробно рассмотрен в очерке «Резистентность к химиотерапии. Причины и пути преодоления». При некоторых формах химерного гена этот блок преодолевается введением большой дозы экзогенной ретиноевой кислоты. Есть предположение, что избирательная чувствительность этой формы промиелоцитарного лейкоза к ретиноевой кислоте связана не с особенностями слияния генов, а с сохранением в клетках опухоли активного Р53 гена, при образовании других форм химерного гена происходят дополнительные мутации, в том числе и в гене Р53, ингибирующем апоптоз [94].

Одним из ключевых моментов развития опухолевого процесса является снижение противоопухолевого иммунного надзора. Известно, что в этих процессах активное участие принимают сами опухолевые клетки, секретируя растворимые им-

муносупрессивные факторы и снижая иммуногенную активность экспрессированных на своей поверхности молекул главного комплекса гистосовместимости [94,95]. Однако исследования последних лет [94,96,97,98] выявили альтернативный механизм подавления опухолевыми клетками иммунного надзора, оказавшийся связанным с апоптозом.

FAS-R, также называемый CD95 или APO-1, является членом семьи рецепторов к TNF и широко распространен среди клеток разных видов, в том числе Т- и В-лимфоцитов и некоторых опухолевых клеток. Связывание FAS-R с FAS-лигандом (FAS-L) индуцирует апоптоз в клетках его экспрессирующих. FAS-L выделяется цитотоксическими Т-лимфоцитами и NK-клетками и является “фактором смерти”, индуцирующим апоптоз в клетках-мишенях. Экспрессия FAS-L клетками некоторых территорий (например, стромы глаза или Сертолиевыми клетками яичек) немедленно убивает попавшие туда активированные клетки воспаления, обеспечивая тем самым запрет иммунных реакций на этих территориях [99]. Эти данные побудили поиск экспрессии FAS-L на опухолевых клетках. Такой поиск увенчался успехом - FAS-L был выявлен в сыворотке больных с лейкозами и лимфомой [100], а также на клетках некоторых солидных опухолей [94,95]. FAS-L оказались функционально активными, т.к. способны были убивать клетки-мишени, экспрессирующие FAS - рецептор, при совместном культивировании. Эти данные явились основанием для создания гипотезы, по которой опухолевые клетки могут отражать иммунную атаку, убивая цитотоксические Т-лимфоциты и NK-клетки. При этом экспрессия FAS-R на опухолевых клетках часто бывает снижена и/или нарушен механизм реализации поступающих с этого рецептора проапоптотических сигналов [94]. При экспрессии FAS-L на опухолевых клетках его растворимая форма может попадать в циркуляцию, провоцируя клетки, имеющие на своей поверхности FAS- рецептор, к апоптозу и тем самым вызывая мультиорганные поражения, часто наблюдаемые у онкологических больных [100].

1.5. Апоптоз и противоопухолевая терапия

Исследования последних лет [74,104,105] показали, что противоопухолевые препараты вызывают апоптоз, т.е. индуцируют самоубийство опухолевых клеток, используя те же пути, что и физиологические индукторы апоптоза: стимуляцию гена Р53, модуляцию генов семьи Bcl-2, включение FAS-рецептора, активацию эффекторных протеаз и эндонуклеаз, блокирование рецепторов антиапоптотических ростовых факторов и стимуляция проапоптотических. При этом многие опухоли сохраняют способность к апоптозу в ответ на те же стимулы, что и их нормальные аналоги [10,11,63]. Этим объясняется успех антиандрогеновой терапии при раке предстательной железы и частую регрессию опухоли молочной железы при лечении антагонистами

эстрогеновых рецепторов. Цитокины могут оказывать проапоптотическое действие и путем повышения уровня эндогенных глюкокортикоидов [106]. Большие дозы препаратов (например, высокие дозы метотрексата) вызывают разрушение клеток путем некроза, что является значительно более токсичным для больного [107].

Хотя вид клеточной смерти зависит от концентрации препарата, в большей степени выбор остается за клетками. Иными словами, химиопрепараты вызывают апоптоз в клетках, готовых к нему.

Способность к спонтанному апоптозу лейкемических клеток *ex vivo* коррелирует с их лекарственной чувствительностью [30,101,102]. Более того, получены убедительные данные, доказывающие, что наиболее благоприятное течение гипердиплоидных случаев ОЛЛ у детей (с числом хромосом более 51) связано с повышенной способностью этих клеток к спонтанному апоптозу и нечувствительностью к антиапоптотическому действию цитокинов в пробах *ex vivo* [103].

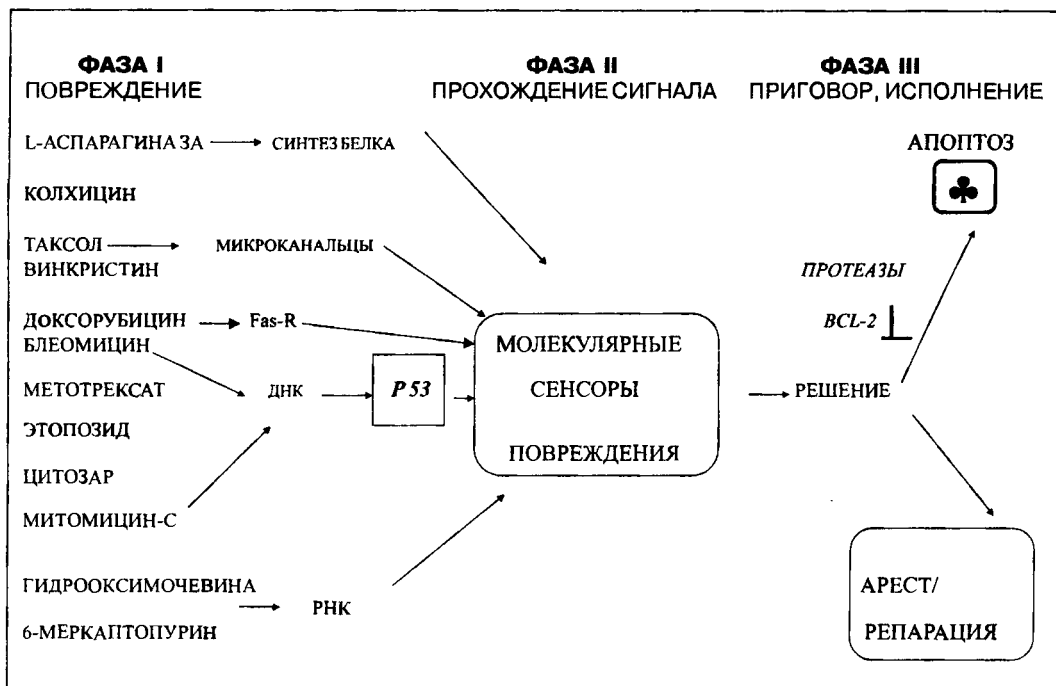


Рис. 1.8. Схема проапоптотического действия химиотерапии [108]

Гипотетические фазы индукции апоптоза в ответ на действие химиотерапевтических препаратов. В фазе I агент вызывает повреждение жизненноважных компонентов клетки (ДНК, РНК, микроканальцы, белковый синтез); в фазе II – клетка распознает силу и характер повреждения с помощью мало изученных сигнальных механизмов; в фазе III – клетка оценивает степень поражения и принимает адекватное решение (арест, репарация, дифференцировка или апоптоз).

Для объяснения механизмов включения апоптоза химиопрепаратами, можно воспользоваться гипотезой^[108], по которой дефект, вызываемый ими в опухолевых клетках, считывается как инструкция к запуску апоптоза. В соответствии с этой гипотезой клеточная смерть, индуцированная химиопрепаратами, проходит 3 фазы (см.рис.1.8):

1. Повреждение. В этой фазе каждый препарат, действуя на свои мишени (ДНК, РНК, микроканальцы и др.), вызывает их повреждение или дисфункцию.

2. Прохождение сигнала. В этой стадии клетка расшифровывает и оценивает полученное повреждение. Например, повреждение ДНК включает ген Р53, следствием чего, как рассматривалось выше, является остановка клетки при прохождении митотического цикла и при невозможности репарации — апоптоз. Некоторые препараты, например, доксорубицин, могут действовать в обход гена Р53, вызывая апоптоз путем активации Fas- рецептора^[90].

3. Индукция апоптоза. В этой фазе принимается окончательное решение и запускаются механизмы апоптоза в тех случаях, когда репарация невозможна. Нормальные клетки чаще принимают решение выйти из митотического цикла для дальнейшей репарации или дифференцировки. Такое решение раковые клетки принимают редко, значительно чаще выбирая в качестве альтернативы — апоптоз.

Необходимо отметить высокую готовность к апоптозу кроветворной ткани и опухолей, исходящих из нее^[66], что скорее всего объясняет лучшую эффективность химиотерапии при гемобластозах по сравнению с солидными опухолями. Способность клеток-предшественников кроветворной ткани человека к апоптозу находится в обратной зависимости от возраста^[109], чем, вероятно, частично можно объяснить лучшую курабельность острых лейкозов у детей, чем у взрослых.

Несмотря на существенное улучшение результатов химиотерапии в онкологии, достигнутое в последние годы за счет повышения ее интенсивности и отработки методов сопроводительной терапии, в определенном проценте случаев, иногда значительном (в зависимости от вида опухоли) развивается резистентность к химиопрепаратам. Это препятствует полной эррадикации опухоли и обрекает лечение на неудачу. Дальнейшее улучшение результатов химиотерапии в онкологии связано в значительной мере с преодолением лекарственной резистентности (подробнее об этом в очерке 3).

1.6. Новая стратегия противоопухолевой терапии

Новая стратегия противоопухолевой терапии, ориентированная на апоптоз, может включать два направления:

- снятие резистентности к проапоптотическому действию химиотерапии;
- индукция апоптоза в опухолевых клетках альтернативными путями.

К первому направлению относятся попытки использования олигонуклеотидных ан-

тител и специфических химиопрепаратов, направленных на подавление активированных генов антиапоптотической активности, таких, как ген Bcl-2 или химерный ген abl/bcr^[110]. Инактивация Bcl-2 гена может быть достигнута направленными антителами^[114] или антителами к Bcl-2-РНК^[115], а также использованием сплайсовых форм этих генов, работающих как специфические доминантные ингибиторы^[111,112]. Тот же эффект в эксперименте был достигнут применением олигонуклеотидных антител, направленных на подавление белка Survivin — ингибитора каспазы-3, экспрессия которого часто оказывалась высокой в опухолевых клетках и способствовала развитию резистентности к химиотерапии^[116].

Такое выключение ведущих генов апоптоза не представляется очень опасным для нормальных тканей, так как пути апоптоза различны в разных тканях, например, потеря Bcl-2 гена хорошо переносится вне иммунной и почечной систем^[113].

Обнадёживающие результаты получены при экспериментальной терапии, мишенью которой является ген Р-53. Многие опухоли содержат, как известно, ген Р-53-мутант, препятствующий апоптозу опухолевых клеток в ответ на действие химиотерапии. Некоторые фармакологические компании разрабатывают клинические протоколы, в которых с помощью аденовирусного вектора вызывают лизис клеток, содержащих только мутировавший ген Р-53^[117]. Другой терапевтический подход представляет из себя генотерапию, в процессе которой с помощью модифицированного ретро- или аденовируса в опухолевые клетки вносится дикий тип гена Р-53, включающий апоптоз в ответ на химиотерапию в эксперименте^[118].

Существенным направлением современной терапии является дискриминация между способностью убивать нормальные и опухолевые клетки, т.е. селективная защита нормальных клеток. Последние исследования онкогенов и путей передачи сигналов дают такую возможность. Так, фармакологическая инактивация дикого типа Р53 в нормальных клетках может предохранить их от цитотоксических доз ДНК-повреждающих средств^[121]. Тот же эффект достигается в экспериментальных исследованиях по внесению гена дегидрофолатредуктазы (инактивирующей метотрексат) в нормальные клетки.

Ко второму направлению относится попытка индуцировать апоптоз в опухолевых клетках, экспрессирующих FAS- рецептор, которая была предпринята с помощью антител, направленных против него, и увенчалась быстрой селективной гибелью этих клеток^[119,120]. Т- и В- лимфоциты, также экспрессирующие этот антиген, не подверглись смерти, что дает новое понимание различия путей апоптоза в нормальных и опухолевых клетках.

Поиск различий в путях реализации апоптоза опухолевыми и нормальными клетками и использование их в терапевтических целях — новое перспективное направление в противоопухолевой терапии.

Литература к очерку

1. Cronkite E. // Blood Cells. - 1988. - Vol. 14. - P. 313-328
2. Владимирская Е. // В кн.: Кинетика форменных элементов крови. - 1976. - С. 25-48
3. Hunter T. // Curr. Opin. Gen. Dev. - 1993. - Vol. 3. - P. 1-5
4. Levine A.E. // Annu. Rev. Biochem. - 1993. - Vol. 62. - P. 623-631
5. Ellis R.E., Yuan J., Horvitz H.R. // Annu. Rev. Biochem. - 1991. - Vol. 7. - P. 663-669
6. Raff M.C. // Nature. - 1992. - Vol. 356. - P. 397-405
7. Jacobson M.D., Burne J.F., Raff M.C. // EMBO J. - 1994. - Vol. 13. - P. 1899-1906
8. Willie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R. // Int. Rev. Cytol. - 1980. - Vol. 68. - P. 25-34
9. Kerr J.F.R., Willie A.H., Currie A.R. // Br. J. Cancer. - 1972. - Vol. 26. - P. 18-25
10. Vaux D.L., Haecker G., Strasser A. // Cell. - 1994. - Vol. 76. P. 777-785
11. Bursch W., Oberhammer F., Schulte-Hermann R. // Trends Pharmacol. Sci. - 1992. - Vol. 13. - P. 24
12. Cohen J.J. // Immunol. Today. - 1993. - Vol. 14. - P. 126-130
13. Sachs L., Lotem J. // Blood. - 1993. - Vol. 82. - P. 15-20
14. Buttkie T.M., Sandstrom P. // Immunol. Today. - 1994. - Vol.
15. Reed J.C. // J. Cell Biol. - 1994. - Vol. 124. - P. 1-10
16. Voux D.L., Weissman I.L., Kim S.K. // Science. - 1992. - Vol. 258. - P. 1955-1959
17. Погорелов В.М., Козинцев Г.И. // Гематол. и трансфузиол. - 1995. - № 5. - С. 17-25
18. Ellis R.E., Jacobson H.R., Horvitz H.R. // Genetics. - 1991. - Vol. 129. - P. 79-85
19. Faddok V.A. // J. Immunol. - 1992. - Vol. 149. - P. 4029-31
20. Hall S.E., Savil J.S., Henson P.M., Haslett C. // J. Immunol. - 1994. - Vol. 153. - P. 3218-21
21. Thorberry N.A., Lazebnik Y. // Science, 1998, 281, 12-16
22. Enari M., e.a. // Nature, 1998, 391, 43-46
23. Liu X.S., Zou H., e.a. // Cell, 1997, 89, 175
24. Takahashi A., e.a. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 8395
25. Orth K., Chinnaiyan A., e.a. // J. Biol. Chem., 1996, 271, 16443
26. Kothakota S., e.a. // Science, 1997, 278, 294
27. Cryns V., Yuan J. // Genes Dev., 1998, 12, 1551
28. Rheaume E., e.a. // EMBO J., 1997, 16, 6346
29. Ambrosini G., Adida C., Altieri D. // Nat. Med., 1997, 3, 917-921
30. Blagosklonny M. // Leukemia, 2000, 14, 1502-1518
31. Fadeel A., e.a. // Leukemia, 2000, 14, 1502-1518
32. Wickremasinghe R., Hoffbrand V. // Blood, 1999, 93, 3587-3600
33. Hansen R., Oren M. // Current Opinion in Genetics, 1997, 7, 46-51
34. Jacks T., Weinberg R.A. // Nature, 1996, 381, 643-644
35. Lane D.P. // Nature, 1992, 358, 15-16
36. Xiong Y., Hannon G., e.a. // Nature, 1993, 366, 701-704
37. Lowe S., Lin A. // Cancerogenesis, 2000, 21, 485-495
38. Tanaka H., Arakawa H., e.a. // Nature, 2000, 404, 42-49
39. Blau O., Avigad S., e.a. // Int. J. Pediatric Hemat./Oncology, 2000, 6, 361-367
40. Bakhshi A.J., Jensen P., Goldman P. et al // Cell. - 1985. - Vol. 41. - P. 889-906
41. Tsujimoto Y., Gorham J., Cossman J. et al // Science. - 1985. - Vol. 229. - P. 1390-1393
42. Cleary M., Smith S., Sclar J. // Cell, 1986, 47, 19
43. Pellegrini M., Strasser A. // J. Clin. Immunol., 1999, 19, 365-375
44. Kelekar T., Thompson C. // Trends Cell. Biol., 1998, 8, 324-330

45. Puthalakath H., Huang D., O'Reily L., e.a. // Mol.Cell, 1999, 3, 287-296
46. Oltvai Z., Korsmeyer S. // Cell, 1994, 79, 189-192
47. Waterhouse N., Green D. // J.Clinical Immunol., 1999, 19, 378-386
48. Jacotot E., Costantini P., e.a. // Ann.N.J.Acad.Sci., 1999, 887, 18-30
49. Marzo I., e.a. // J.Exp.Med., 1998, 187, 1261-1271
50. Jurgensmeier J., e.a. // Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1998, 95, 4997-5002
51. Zou H., Li Y., Wang X. // J.Biol.Chem., 1999, 274, 11549-11556
52. Susin S., Lorenzo H., Zamzami N., e.a. // Nature, 1999, 397, 441-446
53. Hu Y., Benedict M., e.a. // Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1998, 95, 4386-4391
54. Musio M., Stockwell B., e.a. // J.Biol.Chem., 1998, 273, 2926-2930
55. Ashkenazi A., Dixit V. // Science, 1998, 281, 1305-1308
56. Malinin N., Boldin M., e.a. // Nature, 1997, 385, 540-544
57. Yin Foo S., Nolan G. // Trends Genet., 1999, 15, 229-235
58. Yonish Rouach E., Grunwald D., Wildert S. // Mol. Cell Biol. -1993.- Vol.13.- P.1415-1423
59. Sabbatini P., Lin J., Levine A., White E. // Genes&Dev. -1995.- Vol.9.- P.2184-2192
60. Evan G.I., Wyllie A., Gilbert C. et al // Ctl. -1992.- Vol.69.- P.119-128
61. Wu G.S., Burns T.F., e.a. // Nature Genet., 1997, 17, 141-143
62. Danmeade S., e.a., Cancer Control J., 2000, 3, 4, 1-10
63. Steller H., Grether M. // Neuron. -1994.- Vol.13.- P.1269-1275
64. Hengartner M., Horwitz H. // Cell. -1994.- Vol.76.- P.665-676
65. Thompson C.B. // Science. -1995.- Vol.267.- P.1456-1458
66. Steller H. // Science. -1995.- Vol.267.- P.1445-1449
67. Trentin J. // Transplant. Proc. -1978.- Vol.10.- P.77-81
68. Dexter T. // Br. Med. Bull. -1989.- Vol.45.- P.337-349
69. Metcalf D. // Lancet. -1989.- Vol.1.- P.825-827, 885-887
70. Manadt A., Murti K., Coustan Smith E. et al // Blood. -1994.- Vol.83.- P.758-766
71. Panayiotidis P., Ganeshaguru K., Jabbar S. et al // Br.J.Haematol. -1994.- Vol.86.- P.169-174
72. Kyprianou N., Alexander R., Isaacs J. // J.Ntl.Cancer Inst. -1991.- Vol.83.- P.346-350
73. Lotem J., Sachs L. // Blood. -1992.- Vol.80.- P.1750-1757
74. Gruber J., Greil R. // Int.Arch.Allergy Immunol. -1994.- Vol.105.- P.368-373
75. Isacson O. // Trends Neurosci. -1993.- Vol.16.- P.306-315
76. Meyaard L. // Science. -1992.- Vol.257.- P.217-221
77. Yoshida Y. // Leukemia. -1993.- Vol.7.- P.144-151
78. Hoffman B., Lieberman D. // Oncogene. -1994.- Vol.9.- P.1807-1811
79. Владимирская Е., Румянцев А. // Гематол.и трансфузиол. -
80. Boudreau N., Simpson C., Werb Z. et al. // Science. -1995.- Vol.267.- P.891-895
81. Kantarjian H., Deisseroth A., Kurzrock R. et al. // Blood. -1993.- Vol.82.- P.691-696
82. Kelliher M., Knott A., McLaughlin J., et al. // Mol.& Cell Biol. -1991.- Vol.11.- P.4710-4712
83. Wickermasinghe G., Hoffbrand V., Blood, 1999, 93, 11, 3587-3600
84. Evan G., e.a. // 1992, Cell, 69, 119-128
85. Strasser A., Harris A., e.a. // Nature, 1990, 348, 331-333
86. Gross A., McDonnell J., e.a. // Genes Dev., 1999, 13, 1899-1911
87. Yonish Rouach E., Grunwald D., Wildert S. // Mol. Cell Biol. -1993.- Vol.13.- P.1415-1423
88. Sabbatini P., Lin J., Levine A., White E. // Genes&Dev. -1995.- Vol.9.- P.2184-2192
89. Самочатова Е., Румянцев А. // Гематол.и трансфузиол. -1996.- №2.- С.29-32
90. Kakizuka A., Miller W., Umesono K. et al // Cell. -1991.- Vol.66.- P.663-667

91. Grignani F., Fagioli M., Alcalay M. et al // Blood. -1994. -Vjl.83. -P.10-13
92. Nakamura T., Alder H., Gu Y. et al // Proc. Natl. ACAD. sci. -1993. -Vol.90. -P.4631-4635
93. Appelbaum F., Downing J., Willman Ch. // Hematology. -1995. -Educ. Progr. -P.23-35
94. Strand S., Hoffmann W., Hug H. et al // Nature Med. -1996. -Vol.2. -P.1361-1366
95. Nagata Sh. // Nature Med. -1996. -Vol.2., P.1306-1308
96. Hahne M., // Science. -1996. -Vol.274. -P.1363-1366
97. O'Connell J., O'Sullivan G., Collins J., Shanahan F. // J. Exp. Med. -1996. -Vol.184. -P.1075-8
98. Nagata S., Goldstein P. // Science. -1995. -Vol.267. -P.1449-1456
99. Griffith T., Brunner T., Fletcher S. et al // Science. -1995. -Vol.270. -P.1189-1192
100. Tanaka M. // Nature Med. // -1966. -Vol.2. -P.317-322
101. Efferth T., Fabry U., Oseika R. // Leukemia, 1997, 11, 1180-1186
102. Blagosclonny V. e.a. // Int. J. Oncol., 1997, 11, 1165-1170
103. Ito Ch., Kumagai M., e.a. // Blood, 1999, 93, 315-320
104. Hannun Y. // Blood. -1997. -Vol.89. -P.1845-1853
105. Landowski T., Gleason-Guzman M., Dalton W. // Blood. -1997. -Vol.6. -P.1854-1861
106. Gruber J., Sgong R., Hu R. et al // Europ. J. Immunol. -1994. -Vol.24. -P.1115-1121
107. Lennon S., Martin S., Gotter t. // Cell Prolif. -1991. -Vol.24. -P.203-214
108. Hannan Y.A. // Blood, 1997, 89., 1845-1853
109. Yang E., Korsmeyer S. // Blood. -1996. -Vol.88. -P.386-401
110. Smetsters T., Skorski T., von de Locht L. et al // Leukemia. -1994. -Vol.8. -P.129-140
111. Kumar S., Kinoshita M., Noda M. et al // Genes Dev., 1994. -Vol.8. -P.1-5
112. Yin X., Oltvai Z., Korsmeyer S. // Nature. -1994. -Vol.3. -P.321-325
113. Veis D., Sorenson C., Shutter J. // 1993. -Vol.75. -P.229-234
114. Piche a., Com J., e.a. // Cancer Res., 1998, 58, 2134-2140
115. Dorai T., Olsson C., e.a. // Prostate, 1997, 32, 246-258
116. Chen J., Wu W., e.a. // Neoplasia, 2000, 2, 235-241
117. Dam H., Huguier S., e.a. // Genes Dev., 1998, 12, 1227-1239
118. Roush W. // Science, 1997, 278, 1039-1040
119. Trauth B., Klas C., Peters A. et al // Science. -1989. -Vol.245. -P.301-305
120. Debatin K., Goldmann C., Bamford R. et al // Lancet. -1990. -Vol.335. -P.497-500
121. Komarov P. e.a. // Science, 1999, 285, 1733-35

Ростовые факторы в регуляции крововетворения и формировании опухолевого роста



Гемопоэтические ростовые факторы регулируют выживание и пролиферацию ранних предшественников, дифференцировку коммитированных и функциональную активность зрелых клеток ^[1,2,3]. Их объединяют следующие общие свойства:

- они являются гликопротеинами;
- активны *in vivo* и *ex vivo*;
- продуцируются различными клетками;
- имеют специфические функции и в то же время действуют на общие мишени;
- обнаруживают синергизм и аддитивный эффект по отношению к другим ростовым факторам;
- биологическое действие реализуют через связывание со специфическими рецепторами.

2.1. История. Номенклатура. Классификация

Первые представления о том, что в крови присутствуют факторы, активно влияющие на кроветворение, относятся к началу века, когда Carnot и Deflandre в 1906 году индуцировали эритропоэз у кроликов, введя им плазму анемичных животных ^[4].

60 лет спустя две группы ученых — Pluznik, Sachs (1965) в США ^[5] и Bradley, Metcalf (1966) в Австралии ^[6] - независимо друг от друга разработали «полутвер-

дую» агаровую культуральную систему, в которой кроветворные клетки-предшественники давали рост колоний в присутствии определенных ростовых факторов (РФ), получивших в то время название колониестимулирующих факторов (КСФ). Дальнейшее изучение их биологических эффектов на культуральных моделях *ex vivo* позволило выделить различные виды КСФ: гранулоцитарно-макрофагальный (ГМ-КСФ); гранулоцитарный (Г-КСФ); макрофагальный (М-КСФ); мультипотентный, стимулирующий развитие смешанных колоний и получивший позднее наименование Интерлейкина — 3 (ИЛ-3).

В эти же годы проводились и первые интенсивные исследования клеточных взаимодействий в иммунном ответе.

Было выяснено, что кожная реакция гиперчувствительности замедленного типа обусловлена сложными взаимодействиями сенсibilизированных специфическим антигеном лимфоцитов и макрофагов. При этом было показано, что супернатант культуры сенсibilизированных лимфоцитов при их инкубации с антигеном содержит растворимые факторы, способные оказывать эффекты, характерные для реакции гиперчувствительности замедленного типа: характерное поражение кожи ^[7], митогенное действие на лимфоциты ^[8], торможение миграции макрофагов ^[9].

Растворимые факторы, образующиеся при взаимодействии сенсibilизированных лимфоцитов со специфическим антигеном и действующие без учета иммунологической специфичности, получили в 1969 году название «лимфокинов» ^[10]. Этот термин был выбран, чтобы подчеркнуть образование факторов из лимфоцитов и активное их действие (кinezис) в иммунном ответе.

Дальнейшие исследования показали разнообразие действия лимфокинов как в отношении механизма, так и в выборе клеток-мишеней.

В 70-ые годы термин «лимфокины» приобрел более широкое значение и стал использоваться для обозначения факторов, выявляемых в супернатантах лимфоцитов, неспецифически активированных митогенами, культур клеток лимфоидного и нелимфоидного происхождения, а также в сыворотке и моче человека и лабораторных животных. В этот период было описано более ста подобных факторов, обладающих различными функциональными и биохимическими характеристиками ^[11], что вызвало некоторый скептицизм в отношении их роли в организме.

Однако технический прогресс 80-х годов, позволивший выделить многие из них в чистом виде, изучить молекулярно-биологическую структуру и генетическую принадлежность, а также синтезировать их генно-инженерным путем ^[12-14], способствовал лучшему пониманию функций ростовых факторов, что и дало возможность привести классификацию в определенную систему.

Все активно действующие факторы, производимые клетками, включая и ростовые факторы, получили название «цитокинов». Термин «лимфокины» сохранился за цитокинами лимфоидного происхождения, «моноккины» - за производными моноцитов.

Для унификации обозначения факторов, часто имеющих много названий в соответствии с разнообразными функциями в разных биологических системах, с 1979 года используется термин «интерлейкин» (IL) - взаимодействие между лейкоцитами [15].

Так, IL -1 описывался ранее как лимфоцит- активированный фактор (LAF), митогенный протеин (MP), Т-замещающий фактор III (TRF- III) , фактор В-клеточной активации (BAF) и фактор, дифференцирующий В-лимфоциты (BDF). IL -2 известен также как ростовой фактор Т-лимфоцитов (TCGF) и в то же время тимокитарный митогенный фактор (TMF).

Первая классификация интерлейкинов была предложена Международным Союзом Иммунологических обществ (МСИО) в 1992 году [16], в нее вошло 10 интерлейкинов и некоторое число цитокинов, сохранивших прежние названия, связанные с их основной активностью. В последующие годы произошло значительное расширение этого списка.

В табл.2.1 представлены основные цитокины, регулирующие кроветворение и иммуногенез, указаны клеточные мишени их действия. Следует, однако, помнить, что свойства их варьируемы, т.к. стимуляция клетки одним цитокином вызывает в ней каскадную активацию рецепторов к другим, в обычном состоянии не экспрессированным на клетке.

Табл.2.1. Гемопэзические ростовые факторы и мишени для их действия

Цитокины	Мишени действия
St.cell factor	Стволовые клетки, ранние предшественники
EPO	Поздние эритроидные и мегакариоцитарные предшественники
TPO	Стволовые клетки, мегакариоцитарные предшественники, тромбоциты
M-CSF	Поздние предшественники и зрелые моноциты/макрофаги
G-CSF	Делящиеся миелоидные клетки и зрелые нейтрофилы
GM-CSF	Ранние предшественники, гранулоцитарно-макрофагальные предшественники, зрелые нейтрофилы, моноциты, эозинофилы
IL-1 (α,β)	Ранние клетки-предшественники, Т-лимфоциты
IL-2	В- и Т-предшественники и зрелые Т-лимфоциты
IL-3	Все миелоидные предшественники и ранние лимфоидные, зрелые моноциты, макрофаги, мегакариоциты и базофилы
IL-4	Ранние миелоидные и лимфоидные предшественники, предшественники Т-лимфоцитов, базофилы
IL-5	Лимфоидные предшественники, зрелые Т-лимфоциты, эозинофилы
IL-6	Стволовые клетки, предшественники лимфоцитов, Т- и В-лимфоциты

IL-7	Пре-В-лимфоциты, предшественники и зрелые Т-лимфоциты, предшественники мегакариоцитов
IL-8	Зрелые Т-лимфоциты, хемотаксический фактор зрелых нейтрофилов
IL-9	Эритроидные, мегакариоцитарные и Т-клеточные предшественники
IL-10	Макрофаги, тучные клетки, Nk-лимфоциты
IL-11	Ранние предшественники, мегакариоциты, тучные клетки
IL-12	Цитотоксические лимфоциты и натуральные киллеры
IL-13	В-лимфоциты, моноциты, Nk-лимфоциты
IL-14	Гемопозитические стволовые клетки
IL-15	Т- и В-лимфоциты, Nk-лимфоциты
IL-16	Т-лимфоциты, активация и хемотаксис
IFN α, β	Противовирусная активность, тормозит клеточную пролиферацию
IFN γ	Противовирусная активность, стимулирует макрофаги, усиливает созревание и активность В-лимфоцитов
TNF	Стимулирует воспалительный процесс, выброс других цитокинов
TGF	Трансформирующий ростовой фактор, тормозит пролиферацию-стволовых клеток и клеток-предшественников

2.2. Происхождение и функция цитокинов

Достижения молекулярной биологии и генетики последнего десятилетия позволили получить практически все цитокины рекомбинантным путем, выявить их структуру и генетическое происхождение. В табл.2.2 приведены клеточные источники и картирование генов основных цитокинов, вовлеченных в регуляцию кроветворения и иммуногенеза.

Табл.2.2 КЛЕТОЧНЫЕ ИСТОЧНИКИ ЦИТОКИНОВ

Цитокин	Клеточный источник	Локализация гена
IFN-α_1	Лейкоциты	9q13-q22
IFN-β	Фибробласты и эпителиальные клетки	9q13
IFN-γ	Т-лимфоциты, натуральные киллеры	12q24.1
IL-1α	Макрофаги, эндотелиальные клетки, большие гранулярные лимфоциты, Т- и В- лимфоциты, фибробласты, эпителиальные клетки, астроциты, кератиноциты, остеобласты	2q12-q21
IL-1β	- » -	2q13-q21
IL-2	Т-лимфоциты	4q26-q27
IL-3	Т-лимфоциты, тучные клетки	5q23-q31
IL-4	Т-лимфоциты, тучные клетки, костномозговые стромальные клетки	5q23-q31

IL-5	Т-лимфоциты (тучные клетки, В-лимфоциты)	5q23-q31
IL-6	Фибробласты, Т-лимфоциты, макрофаги, эндотелиальные клетки, кератиноциты, тучные клетки	7q21-q14
IL-7	Стромальные клетки тимуса	8q12-q13
IL-8	Моноциты, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки, фибробласты, хондроциты, гепатоциты кератиноциты, синовиоциты	4q12-q21
IL-9	Т-лимфоциты	5q31-32
IL-10	Т-лимфоциты, макрофаги, В-лимфоциты	1
IL-11	Стромальные клетки	?
IL-12	Т-лимфоциты, В-лимфобласты	?
IL-13	Т-лимфоциты	?
IL-14	Т-лимфоциты	?
IL-15	Все клетки?	?
IL-16	Т-лимфоциты, эпителиальные клетки	?
SCF	Фибробласты стромы костного мозга	4q11-q12
GM-CSF	Т-лимфоциты, эндотелиальные клетки, фибробласты, макрофаги, тучные клетки	5q23-5q32
G-CSF	Макрофаги, фибробласты, эндотелиальные клетки, мезотелиальные клетки, Т-лимфоциты	17q21-q22
M-CSF	Фибробласты, моноциты, эндотелиальные клетки	5q33.1
TPO	Клетки печени, почек	3q26-27
EPO	Перитубулярные клетки почки, купферовские клетки печени	7q11-q20
TNF-α	Макрофаги, Т-лимфоциты, тимоциты, В-лимфоциты, натуральные киллеры	6p21.3
TNF-β	Тромбоциты, активированные макрофаги, Т-лимфоциты, мезотелиальные клетки, тимоциты	19q13.1

Однако в отношении функциональной активности цитокинов многое остается неясным: одни и те же цитокины необходимы для пролиферации, дифференцировки и функциональной активности клеток крови и иммунной системы разных уровней созревания и направлений дифференцировки, в то же время для полноценной жизнедеятельности каждой клеточной генерации необходимо сочетанное воздействие различных цитокинов. В табл.2.3 представлены основные цитокины, действующие на клетки крови различных уровней созревания и направлений клеточной дифференцировки, показаны их аддитивный и плейотропный эффекты.

Обычно цитокины, регулирующие кроветворение, делят на следующие группы:

1. РАННИЕ: SCF/kit — лиганд; flt-3 лиганд; основной фактор роста фибробла-

Табл. 2.3. Клеточные мишени действия цитокинов в кроветворении

Цитокины	Полипотентные стволовые клетки	Гранулоцитарно/ макрофагальный росток						Эритропоэтический росток	Лимфоидный росток			Мегакариоцитарный росток
		Предшественники	Пролиферирующие и созревающие клетки КМ	Зрелые клетки					Предшественники	Т-лимфоциты	В-лимфоциты	
				Нейтрофилы	Эозинофилы	Базофилы	Моноциты					
IL-1	+								+		+	
IL-2									+	+	+	
IL-3	+	+	+			+		+			+	+
IL-4						+				+		
IL-5					+						+	
IL-6	+								+	+	+	
IL-7									+	+	+	
SCF	+											
GM-CSF	+	+	+	+	+		+	+				+
G-CSF		+	+	+								
M-CSF							+					
EPO								+				
TPO	+											+

стов, bFGF; IL-6; IL-11; LIF. Действуют на стволовые клетки и ранние предшественники независимо от их линейной принадлежности, потенцируют действие других ростовых факторов [17,18]. Исключение составляет IL-6, который оказывает воздействие и на различные зрелые гемопоэтические клетки [19].

2. Многолинейные: IL-3, GM-CSF. Преимущественно стимулируют пролиферацию и дифференцировку ранних предшественников с образованием смешанных колоний (CFU-GEMM), гранулоцитарно-макрофагальных колоний (CFU-GM), эритроидных бурс (BFU-E) и мегакариоцитарных бурс (BFU-MK). Поддерживают также пролиферацию и переживание CFU-GM, CFU-G, CFU-M и их потомков до терминального созревания [20].

3. Поздние, однолинейные: EPO, G-CSF, M-CSF, IL-5, TPO. Стимулируют дифференцировку однолинейных предшественников. Действуют синергически с многолинейными цитокинами на ранние предшественники, стимулируют функцию зрелых клеток [21,22]. В последние годы получены, однако, данные о присутствии рецепторов к TPO и на полипотентных стволовых кроветворных клетках [54].

4. Ингибиторы пролиферации предшественников: TGF-β (трансформирующий ростовый фактор) обратимо блокирует ранние предшественники вне

митотического цикла ^[23]; IFN- α, β, γ -потенциальные ингибиторы пролиферации гемопоэтических предшественников ^[24]; MIP-1 α тормозит пролиферацию ранних предшественников ^[25].

Однако такая стратификация цитокинов сама по себе не объясняет особенности их синергического, аддитивного и плейотропного действия.

Чем глубже изучается тот или иной цитокин, тем труднее уложить его в прокрустово ложе какой-либо одной классификации. В качестве примера можно привести IL-1^[26]. Будучи, в основном провоспалительным цитокином и медиатором лихорадки, IL-1 проявляет и другие виды биологической активности: является кофактором активации Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов; служит промотором гемопоэза и в то же время рассасывания хряща и кости; активирует функцию нейтрофилов и эндотелиальных клеток сосудов, пролиферацию фибробластов; индуцирует высвобождение белков острой фазы, протеолиз мышечных клеток. И это еще далеко не полный перечень функций только этого цитокина.

Клетки воспринимают цитокиновые сигналы через специфические рецепторы. В структуре и функции этих рецепторов, а также в особенностях внутриклеточной передачи цитокиновых сигналов и следует, по-видимому, искать объяснения особенностей и механизма действия цитокинов.

2.3. Структура и функция цитокиновых рецепторов

В передаче цитокиновых сигналов ведущую роль играют процессы внутриклеточного фосфорилирования и дефосфорилирования, превращающие неактивные сигнальные молекулы в активные.

У большинства ростовых факторов этот процесс начинается с фосфорилирования тирозиновых оснований, входящих в состав внутриклеточной цепочки рецептора, для чего необходим фермент тирозин-киназа.

Исходя из этого, типичные рецепторы гемопоэтических цитокинов делятся на 2 большие группы ^[26]:

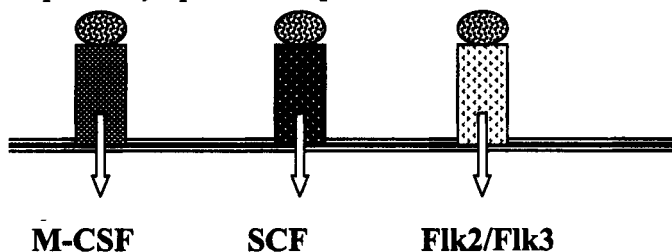
А. Рецепторы, имеющие в своей структуре фермент тирозин-киназу.

В. Рецепторы, не имеющие собственной тирозин-киназы, но использующие для фосфорилирования тирозиновых оснований различные семьи нересепторных внутриклеточных тирозин-киназ.

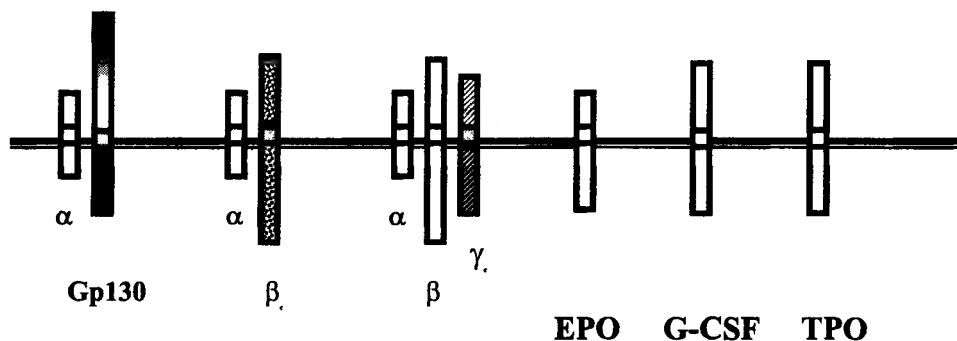
Схематично это представлено на рис.2.1.

К семье **А** относятся рецепторы ростовых факторов M-CSF, SCF (фактор стволовых клеток), и близкий к нему Flk-2/FLK-3 (рецептор/лиганд, отвечающий за вхождение в цикл стволовых клеток).

Активация рецепторов происходит в результате связывания цитокина (лиганда) с экстрацеллюлярной частью рецептора (α -цепь), что вызывает его димеризацию

А. Рецепторы с внутренней тирозин-киназной активностью**В. Рецепторы без внутренней тирозин-киназной активности**

Общая gp130 общая β -цепь общая γ -цепь одна цепь



IL-6	GM-CSF	IL-2
IL-11	IL-3	IL-4
IL-12	IL-5	IL-7
LIF		IL-9
CNTF		IL-13
OSM		IL-15
CT-1		

Рис. 2.1. Виды рецепторов гемопоэтических ростовых факторов. Объяснения в тексте

(удвоение экстра- и интрацеллюлярной цепи). У рецепторов группы А это приводит к активации тирозин-киназного домена вследствие аутофосфорилирования сближенных тирозиновых оснований каждой половины внутриклеточного димера. Аутофосфорилирование активизирует тирозиновые основания, превращая их в места прикрепления эффекторных протеинов, передающих далее активированный цитокиновый сигнал [27].

Функциональное значение этих рецепторов и связанных с ними цитокинов подтверждается в экспериментах на мышах-мутантах с выключением соответствующих генов. Так, естественные мыши-мутанты, известные как *W* и *S1*, с отсутствием генов, кодирующих SCF и его Kit-лиганд, демонстрируют острый дефицит стволовых кроветворных клеток ^[28]. У других мышей с врожденным остеопорозом обнаруживается мутация в гене рецептора M-CSF (идентичен протоонкогену *c-fms*), что ведет к дефекту макрофагов и остеокластов, формирующему эту патологию ^[29].

Большинство цитокиновых рецепторов относятся к **семье В**. Для нее характерно отсутствие рецепторной тирозин-киназной активности и наличие у большинства из них общих цепей во внутриклеточной части рецепторов. Именно с этими общими цепями связано формирование и передача цитокиновых сигналов. По наличию общих цепей рецепторы этой семьи делятся на 4 группы (см.рис.2.1):

1. Общая внутриклеточная цепь, передающая сигнал, - гликопротеин 130 (gp 130).

К этой группе относятся рецепторы к IL-6, LIF (leukemia inhibitory factor), CNTF (ciliary neurotrophic factor), OSM (oncostatin-M), IL-11, IL-12 и CT (кардиотрофин — 1). Рецепторы этой группы имеют уникальную экстрацеллюлярную α -цепь, обеспечивающую специфическое связывание с цитокином и общую внутриклеточную цепь gp 130. Цитокины этой группы оказывают схожие эффекты на клетки, имеющие к ним рецепторы, т.к. пользуются общим сигнальным трансдуктором - gp 130 ^[30].

2. Общая внутриклеточная цепь, передающая сигнал — β -цепь (β_c).

К этой группе относятся рецепторы IL-3, GM-CSF, IL-5. Так же, как и в предыдущей группе, эти цитокины пользуются для специфического связывания α -цепью и имеют много общего в проведении цитокинового сигнала ^[31].

3. Рецепторы, имеющие 2 внутриклеточные цепи — β - и γ , общей из них является γ -цепь (γ_c).

К ним относятся рецепторы IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15. Особенностью цитокинов этой группы является то, что все они вовлечены в различные стадии развития Т-лимфоцитов. β - цепь участвует в высокоафинном связывании цитокина, однако же формирование и прохождение сигнала у всех цитокинов этой группы связано только с функционированием общей γ -цепи ^[32]. Показательным в этом отношении является, например, то, что мутация в гене γ_c — цепи приводит к глубокому Т-клеточному дефициту ^[33].

4. Рецепторы, имеющие только одну уникальную внутриклеточную цепь.

К ним относятся рецепторы G-CSF, EPO (эритропоэтина) и TPO (тромбопоэтина). Рецепторы этой группы состоят из единственной полипептидной цепи, внеклеточная часть которой отвечает за специфическое связывание, а внутриклеточная за формирование и передачу сигналов пролиферации и дифференцировки ^[34].

Цитокиновые рецепторы могут быть выявлены на поверхности клеток с помощью моноклональных антител в соответствии с кластерной классификацией, предлагаемой в табл.2.4.

Табл.2.4. Кластерная классификация цитокиновых рецепторов

Вид рецептора	Кластер дифференцировки
IL-1R type1	CD -121a
IL-1R type2	CD -121b
IL-2R alpha	CD - 25
IL-2R beta	CD -122
IL-3R alpha	CD -123
IL-4R	CD - 124
IL-5R	CD -125
IL-6R alpha	CD -126
IL-6R beta (gp-130)	CD -130
IL-7R	CD -127
IL-8R	CD -128
G-CSFR	CD -114
M-CSFR	CD -115
GM-CSFR	CD -116
SCFR (c-kid)	CD -117
IFNalphaR	CD -118
IFNbetaR	CD -118
IFNgammaR	CD -119
TNFR-1	CD -120a
TNFR-II	CD -120b
Общая beta цепь	CD -131
Общая gamma цепь	CD -132
FLT3	CD -135
MSPR	CD -136
PDGFalphaR	CD -140a
PDGFbetaR	CD -140b

2.4. Активация цитокинового рецептора

Ключевым моментом в формировании цитокинового сигнала является фосфорилирование тирозиновых оснований внутриклеточной части большинства цитокиновых рецепторов. Как было сказано, основная масса цитокиновых рецепторов не обладает собственной тирозинкиназной активностью и привлекает для фосфорилирования нерецепторные внутриклеточные тирозин-киназы. Ниже приводятся основные «семьи» используемых для этого тирозин-киназ.

A. Jak (Janus tirosin kinas) – семья.

В эту группу киназ входят четыре вида: *Jak1*, *Jak2*, *Jak3* и *Tyk2*. Активация киназ этой группы происходит в ответ на связывание цитокина с его рецептором. При этом *Jak1*, *Jak2* и *Tyk2* экспрессированы во многих клеточных типах и активируются различными цитокинами. Напротив, экспрессия *Jak3* наблюдается только в гемопоэтических клетках миелоидного и лимфоидного типов ^[35]. Так, при созревании миелоидных клеточных линий под действием G-CSF наблюдается увеличение *Jak3* мРНК ^[35]. *Jak3* также используется для активации γ_c – цепи, общей для рецепторов IL-2-семьи цитокинов. О важной роли *Jak3* в развитии Т- и В-лимфоцитов свидетельствует развитие острого комбинированного иммунодефицита у мышей с выключенным *Jak3*-геном ^[36].

B. Src-семья

В эту группу входит большое число нерецепторных тирозин-киназ, объединенных общими структурными свойствами. В гемопоэтических клетках чаще других встречаются *Blk*, *Fgr*, *Fyn*, *Lck*, *Hck*, *Lyn*. Эти киназы широко привлекаются не только для активации рецепторов, но и для проведения специализированных сигналов. Особенно это касается *Hck* и *Fgr* – киназ, участвующих в реализации специализированных сигнальных путей активации макрофагов. Получены данные, подтверждающие значение *Hck* в активации как β_c – цепи, так и общей цепи *gp130* при проведении сигналов IL-3, GM-CSF, LIF в гемопоэтических клетках ^[37]. *Lyn* – киназа имеет значение в активации EPO-рецептора, дифференцировке эритронобластов ^[38].

C. Fps/Fes семья

Гены, кодирующие образование этих киназ, относятся к протоонкогенам типа *c-fes* ^[39]. Киназы этого типа широко экспрессированы в миелоидных клетках, особенно в гранулоцитах и моноцитах. Активируют рецепторы разных типов (IL-6, IL-3, G-CSF, EPO и др.), участвуют в реализации конечной клеточной дифференцировки, супрессируют апоптоз ^[40].

D. Tec/Btk семья

Представленные в этой семье киназы тесно взаимодействуют с *Fps/Fes* киназами и сходны с ними по структуре. Широко представлены в клетках печени и гемопоэза ^[41]. Мутация в *Btk* (Брутоновская тирозин-киназа) связана с X-сцепленной агаммаглобулинемией ^[42]. *Tec* активирет прохождение сигнала от различных цитокиновых рецепторов, включая IL-3, IL-6, SCF, EPO ^[43].

Е. Syk/ZAP70 семья

Эта группа тирозин-киназ в большей мере связана с проведением сигналов от антигенных рецепторов В- и Т-лимфоцитов ^[44]. Кроме этого нельзя исключить критической роли Syk-киназы в активации рецептора G-CSF ^[45].

Основное назначение перечисленных выше тирозин-киназ, так же, как и внутрирецепторных тирозин-киназ, - фосфорилирование тирозиновых оснований сигнальной цепи цитокиновых рецепторов. Фосфорилирование — необходимое условие для создания тирозиновыми основаниями специфических мест для прикрепления SH2 доменов сигнальных белков, задача которых передать жизненно важным структурам клетки сигнал цитокина.

2.5. Передача цитокинового сигнала.

Среди множества сигнальных внутриклеточных белков у гемопоэтических клеток особенно важными являются молекулы, объединенные общим названием Stat (sygnal transductors and activators of transcriptions) — факторы, передающие сигнал в ядро клеток и активирующие транскрипцию генов. Эти молекулы, содержащие SH2 домены, находятся в клетках в неактивном состоянии. Тирозиновые основания внутриклеточного цитокинового рецептора, активированные фосфорилированием, привлекают к себе неактивные Stat's с SH2 доменами. Тирозин-киназы, связанные с рецептором (Jak's и др), активируют Stat's путем фосфорилирования, вызывая их димеризацию. Активированные Stat's отходят от рецептора, проникают в ядро, связываются со специфическими элементами ДНК и вызывают их транскрипцию. Схематически это представлено на рис.2.2.

Существует 7 различных форм Stat, избирательно связывающихся с тирозиновыми основаниями цитокиновых рецепторов, каждая из них имеет и свои преимущественные пути тирозин-киназной активации. Возможно, от того, какая форма Stat подвергается активации, в значительной мере зависит и различная реализация цитокинового сигнала (пролиферация, дифференцировка, апоптоз, выживание и др.)^[46]. Есть достаточно оснований считать ^[47], что избирательная генерация цитокинового сигнала связана с функцией активированных тирозиновых оснований. При этом у большинства цитокинов пролиферативные сигналы генерируются в проксимальной части внутриклеточной сигнальной цепи рецептора, сигналы на дифференцировку — в средней части, а регуляция апоптоза связана с дистальным участком рецепторной цепи.

Функции различных видов Stat представлены в табл.2.5

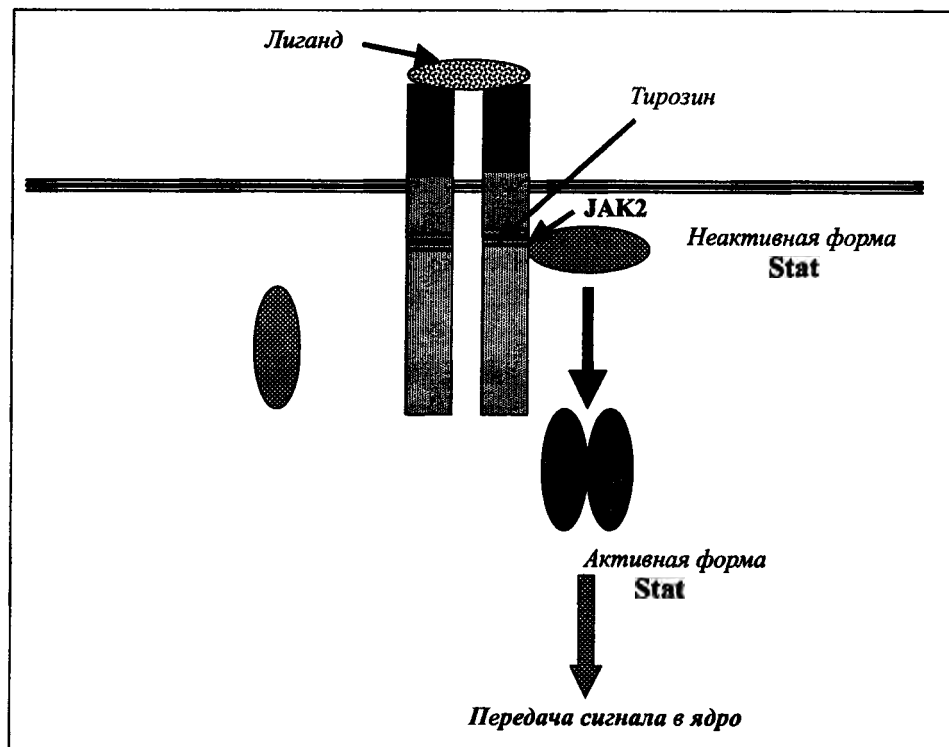


Рис. 2.2. Передача цитокинового сигнала в клетке. Объяснения в тексте.

Табл. 2.5. Функциональная активность Stat

Форма Stat	Связь с цитокином	Нарушения при блокировании Stat в эксперименте
Stat1	IFN α , β , γ , IL-6, IL-10	Повышение восприимчивости ко многим вирусам и микроорганизмам
Stat2	IFN β , γ	Неизвестно
Stat3	IL-2, IL-6, IL-10, IL-11, IL-12, G-CSF, LIT	Летальная мутация для эмбриона
Stat4	IL-12	Нарушение дифференцировки Т-хелперов
Stat5a	IL-2, IL-3, IL-5, IL-15, GM-CSF	Повышение способности к апоптозу клеток крови и иммунной системы, медленное размножение лимфоцитов, торможение дифференцировки миелоидных клеток
Stat5b	Prolactin, EPO, TPO, IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15	- « -
Stat6	IL-4, IL-13	Снижение ответа на аллергены воздушного пассажа

Негативным регулятором основного, тирозин-киназного, пути передачи сигналов являются тирозиновые фосфатазы, которые активируются в процессе тирозинового фосфорилирования самим цитокиновым рецептором, являясь его структурной частью, и необходимы для прекращения сигнала. Основной функцией этих гемопоэтических клеточных фосфатаз (HCP) является инактивация JAKs, ведущая к прекращению цитокинового сигнала [48].

В клетках крови и иммунной системы существуют и другие, не тирозин-киназные пути формирования и передачи цитокиновых сигналов. Активация многих цитокиновых рецепторов связана с экспрессией эффекторного белка RAS-онкогена (p21 или RAF), что ведет, в свою очередь, к активации протеиновых и серин/треониновых киназ, объединенных в общую группу, известную под названием «протеин-киназа C» (PKC) [49, 50]. Эти киназы способны взаимодействовать с тирозин-киназами, модулируя их активность, и самостоятельно фосфорилировать другие транскрипционные факторы, в том числе и эффекторные домены некоторых цитокиновых рецепторов, не относящихся к семье тирозин-киназных рецепторов (например, IL-1-R, TGF-R, и др.) [26]. Эти же механизмы играют существенную роль и в передаче проапоптотических сигналов от рецепторов региона «клеточной смерти» (FAS-R, TNF-R). Путем протеин-киназного фосфорилирования реализуется большинство дифференцирующих сигналов, а также митогенные и антиапоптотические сигналы, независимые от тирозин-киназного механизма. Такой способ контроля механизмов апоптоза особенно выражен у миело-моноцитарных клеток.

2.6. Механизмы реализации регуливающей роли цитокинов в кроветворении

Анализируя накопившиеся к настоящему времени сведения о формировании и проведении цитокиновых сигналов в кроветворных клетках можно сделать следующие обобщения:

- Для активации рецептора ростовых факторов и проведения цитокинового сигнала используются внутриклеточные факторы, набор которых генетически детерминирован для каждого вида клеток и на каждом уровне клеточной дифференцировки.

- Внутриклеточные молекулы, необходимые для проведения цитокиновых сигналов, находятся в клетке в неактивном состоянии; инструментом их активации является фосфорилирование, представляющее собою сложную многовариантную цепочку, включающуюся активацией рецепторов цитокинов.

- Выбор пути проведения цитокинового сигнала и характера его конечной реализации (пролиферация, дифференцировка, апоптоз и др.) зависят от 2-х групп факторов: структуры и характера активации рецептора, с одной стороны, и особенностей метаболизма клетки-мишени, с другой.

Наличие общих внутриклеточных цепей у рецепторов различных цитокинов подчеркивает важность для клетки реализации тех программ, которые инициируют эти цепи при активации. Эти программы настолько важны для жизни клеток, что возможность их включения различными цитокинами можно рассматривать как некий запас прочности и стабильности связи клеток с микроокружением, без которого они не могут существовать. Чем больше рецепторов разных видов имеет кроветворная клетка, тем шире у нее спектр жизненно важных программ, возможных для осуществления. Можно предположить, что именно поэтому у стволовых кроветворных клеток и ранних клеток-предшественников обнаруживается высокая плотность рецепторов всех классов цитокинов. Отсюда, так называемую, «стохастичность» их клеточной дифференцировки можно рассматривать как результат многофакторного, непредсказуемого для нас, взаимодействия рецепторных возможностей и метаболических особенностей клетки. С этой точки зрения, представляется интересной гипотеза D.G. Terfen^[51, 52], по которой действие на стволовую клетку ростового фактора направленного действия, например, GM-CSF, вызывает в ней активацию транскрипционного фактора миелоидной дифференцировки (PU1) с подавлением всех других транскрипционных факторов. Этот транскрипционный фактор активирует ген GM-CSF-R а, что определяет в дальнейшем движение клетки по миелоидному пути.

С этих позиций, аддитивный эффект цитокинов в кроветворении обеспечивается экспрессией большого числа рецепторов, что можно рассматривать как предоставление клетке оптимальных условий для реализации заложенных в ней возможностей. Известно, что стимуляция одним ростовым фактором вызывает в клетке каскадную экспрессию рецепторов к другим цитокинам. Так, например, при стимуляции *ex vivo* миелоидных предшественников IL-3 или GM-CSF клетки начинают экспрессировать рецепторы к G-CSF, плотность которых на поверхности неактивированных предшественников чрезвычайно низка^[53].

При этом следует отметить, что действие цитокинов является лишь необходимым стимулом для реализации тех программ в клетках, которые генетически предопределены линией дифференцировки и стадией созревания. Так, если имплантировать рецептор эритропоэтина в макрофагальные предшественники, а рецептор M-CSF — в эритроидные предшественники, то эритропоэтин будет стимулировать развитие макрофагальных колоний, а M-CSF — эритроидных^[54].

Представляется интересным проанализировать также и механизм плейотропного действия цитокинов. Такую активность демонстрирует, например, GM-CSF, который оказывает митогенный эффект на уровне пролиферирующих миелоидных клеток и в то же время способствует фагоцитозу зрелых гранулоцитов. Другой пример — IL-5, необходимый для дифференцировки как Т-лимфоцитов, так и эозинофилов.

Для объяснения плейотропности цитокинов в кроветворении могут быть рассмотрены следующие возможные механизмы:

- Клетки разных уровней и направлений дифференцировки могут иметь различные пути для проведения одних и тех же цитокиновых сигналов, что и вызывает их различную конечную реализацию.

- Одни и те же сигнальные пути могут быть реализованы по-разному вследствие влияния на них различных молекул-активаторов и молекул-супрессоров (например, НСР) проведения сигналов. К тому же у клеток может быть разный набор генов-мишеней, способных к активации цитокиновым сигналом.

- Цитокиновый рецептор может одновременно индуцировать противоположные по своей конечной реализации сигнальные пути по крайней мере в некоторых клетках. Их баланс и взаимодействие определяют конечный ответ. Так, TNF одновременно индуцирует проапоптотический сигнал через каспазный каскад и антиапоптотический, воспалительный сигнал через активацию NF-карра В. Результат зависит от взаимодействия этих путей.

Итак, реализация цитокиновых воздействий на клетку — результат многовариантных взаимодействий различных внутриклеточных факторов. Среди этих факторов следует учитывать длительность пребывания отдельных сигнальных молекул в активном состоянии, наличие негативных и позитивных регуляторов сигнальной трансдукции, взаимодействие отдельных сигнальных молекул между собой и способность клетки на генетическом уровне экспрессировать те или иные свойства.

Таким образом, цитокиновую регуляцию кроветворения можно рассматривать как механизм связи клеток крови с окружающей средой. Цитокиновый сигнал необходим для жизнедеятельности клетки. Однако характер ответа на него зависит от самих клеток: экспрессии цитокиновых рецепторов, особенностей формирования и проведения цитокиновых сигналов и генетических возможностей клетки.

2.7. Ростовые факторы и апоптоз кроветворных клеток

Роль ростовых факторов в регуляции апоптоза клеток крови хорошо известна. В последние годы получены неопровержимые доказательства их необходимости для выживания клеток *ex vivo* ^[55,56,57,58]. Наши данные (неопубликованное сообщение) свидетельствуют о том, что инкубация лейкоцитов периферической крови доноров в течение 1 часа с препаратами Граноцит (фирма Рон-Пуленк) и Нейпоген (фирма Ф.Хоффманн Ля-Рош), синтетическими аналогами G-CSF, вызывает торможение способности гранулоцитов к спонтанному апоптозу соответственно в 2,5 и 1,5 раза.

Апоптоз — генетически детерминированная программа физиологической клеточной смерти, которая обеспечивает «демонтаж» клетки без повреждения окружающих тканей ^[59]. Реализация этой программы необходима для освобождения организма от старых, поработанных в избытке или поврежденных клеток.

Каждая соматическая клетка содержит все элементы, необходимые для реализации этой программы (регулирующие апоптоз гены, молекулы проведения сигналов, эф-

факторы расщепления ДНК и др.). Условие существования клетки — постоянное сдерживание этой программы, что в значительной мере обеспечивается антиапоптотическим действием цитокинов, осуществляющих ее связь с микроокружением.

Действие многих ростовых факторов реализуется через внутриклеточную модуляцию программы апоптоза. Связь ростовых факторов с программой апоптоза представлена в очерке 1, табл.1.2.

Большинство ростовых факторов, участвующих в кроветворении, препятствует апоптозу. При этом диапазон их действия широк, не ограничивается только клетками-предшественниками и пролиферирующими костномозговыми элементами, но простирается и на зрелые элементы, своим антиапоптотическим действием обеспечивая их выживание и нормальное функционирование (например, GM-CSF и G-CSF- факторы, необходимые для фагоцитоза нейтрофилов). Однако некоторые ростовые факторы (например, IL-4, IL-10) обладают характерным для цитокинов плеiotропным (как про-, так и антиапоптотическим) действием в зависимости от воспринимающих их клеток-мишеней.

И только несколько цитокинов (TNF_{α} , TNF_{γ} , TGF_{β}) являются облигатными физиологическими ингибиторами гемопоэза. Злокачественная трансформация многих родоначальных, в том числе и гемопоэтических, клеток может произойти в результате потери чувствительности сигнальных путей к действию этих ингибиторных (проапоптотических) ростовых факторов. TGF_{β} , например, тормозит пролиферацию гемопоэтических клеток путем блокирования циклинов, обеспечивающих прохождение клеткой митотического цикла (арестовывая клетки в G_0 — фазе и препятствуя переходу их из G_1 в S -фазы). При многих опухолях обнаружена потеря клетками рецептора к TGF_{β} ^[60].

Антиапоптотическое действие большинства ростовых факторов реализуется через семью Bcl-2 генов или путем ингибирования каспаз — основных эффекторов апоптоза ^[61]. При этом программы апоптоза и реализации цитокиновых сигналов нередко переплетаются. Так, модуляцию функциональной активности семьи Bcl-2 генов цитокины могут осуществлять с использованием классической антиапоптотической программы — путем фосфорилирования проапоптотических генов (Bax, Bad). Это приводит к невозможности образования ими гетеродимеров с антиапоптотическими генами Bcl-2 и Bcl-x — необходимое условие индукции апоптоза ^[62]. Для этих целей цитокины обычно используют серин/треониновое фосфорилирование — путь проведения сигналов, включающийся активацией RAS- онкогена ^[63].

2.8. Ростовые факторы и опухолевый рост

Снижение способности к апоптозу играет существенную роль в развитии многих опухолей ^[64], однако, осуществляется это с помощью различных механизмов, анализ которых может быть полезен для понимания существующих и поиска новых путей подавления опухолевого роста.

Наиболее изученным механизмом подавления апоптоза, лежащего в основе опухолевой трансформации, является аутокринное и паракринное повышение экспрессии ростовых факторов и/или рецепторов к ним в клетках опухолевого клона, происходящее вследствие активации соответствующих онкогенов и делающего клетки опухолевого клона независимыми от микроокружения [65].

Роль ростовых факторов в опухолевой трансформации не исчерпывается этим. Усиление любого звена в проведении и реализации антиапоптотического цитокинового сигнала и, напротив, подавление проапоптотического, возникшие в клоногенной клетке, могут явиться причиной наработки опухолевого клона. Взаимодействие этих факторов с программой апоптоза в клетке схематически представлено на рис.2.3

На рис.2.3 показаны возможные варианты вмешательства цитокинов во внутриклеточную программу апоптоза, способные привести к ее отмене. Активация цитокиновых сигналов может прервать апоптотическую программу клетки на разных уровнях, узловых для ее осуществления:

- уровень формирования антиапоптотического сигнала — аутокринная или паракринная стимуляция выброса цитокинов и/или экспрессии цитокиновых рецепторов на клетках опухоли;
- уровень прохождения проапоптотического сигнала - активация онкогенов, ответственных за наработку основных сигнальных белков цитокинового каскада;
- уровень семьи Bcl-2 — ингибция проапоптотических генов;
- уровень эффекторной фазы апоптоза — ингибция каспаз.

Способность к автономному росту лейкоэмических бластов при миелоидных формах острых лейкозов *ex vivo* была замечена давно [66]. Позднее было показано, что в большинстве случаев это связано с аутокринной продукцией G-CSF и GM-CSF в бластных клетках при M1, M2, M4, M5 и смешанных Т/В-линейных формах ОЛЛ и является плохим прогностическим признаком [67,68].

Экспрессия G-CSF-R была выявлена на лейкоэмических лимфобластах при пре-В-ОЛЛ с транслокацией 11q23 и перестройкой MLL-гена, что приводило к усилению пролиферации под действием G-CSF и также свидетельствовало о плохом прогнозе [69].

При В-клеточных неходжкинских лимфомах плохим прогностическим фактором считается повышение аутокринной продукции опухолевыми клетками IL-10 [70].

Типичный пример паракринной цитокиновой стимуляции опухолевого роста демонстрируют миеломная болезнь и некоторые лимфомы [71, 72]. Было показано, что клетки этих опухолей стимулируют в микроокружении секрецию повышенного количества IL-6 и при этом сами становятся зависимыми от него на поздних стадиях опухолевой прогрессии.

При хроническом миелолейкозе транслокация t(9;22), известная под названием Филадельфийской хромосомы, приводит к образованию химерного гена *abl/bcr*, продуктом которого является онкобелок, обладающий повышенной тирозинкиназной ак-

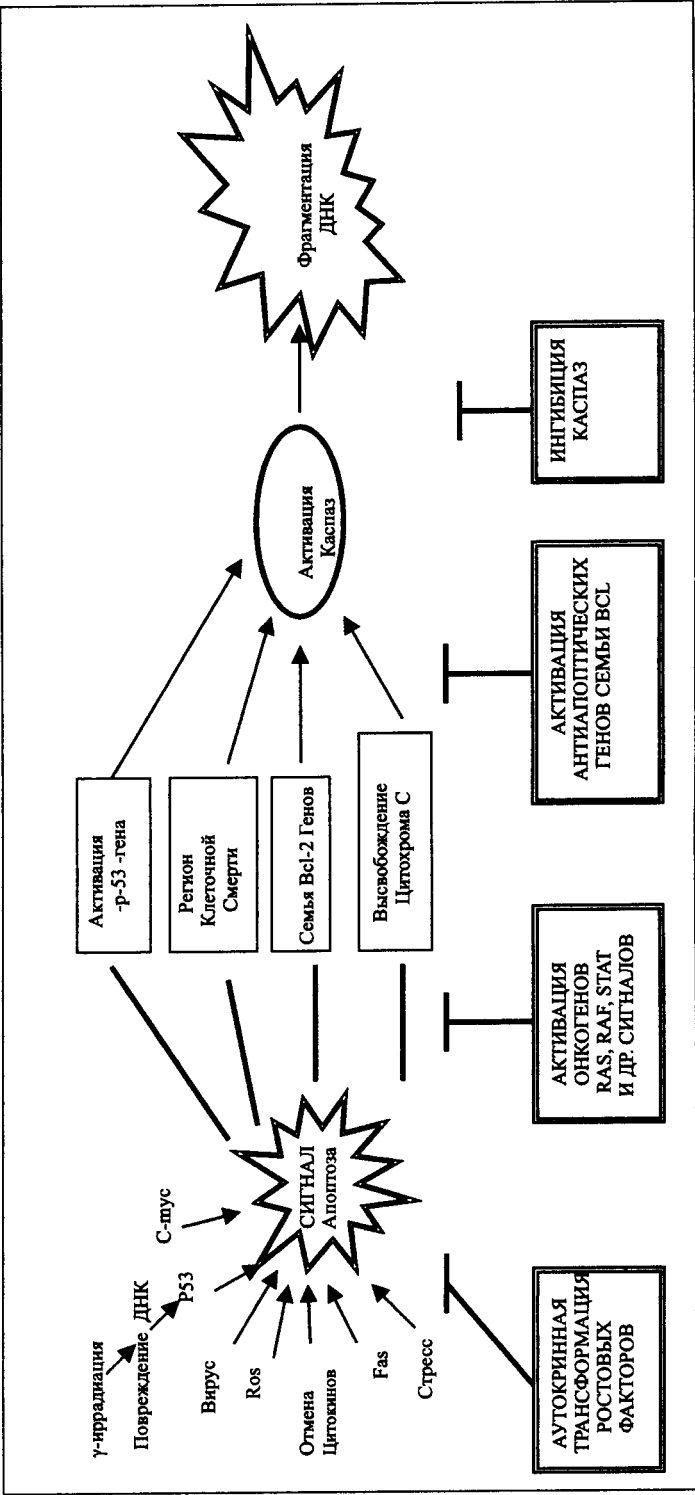


Рис.2.3. Схема взаимодействия ростовых факторов с программой апоптоза. Объяснения в тексте.

тивностью и служащий важным звеном в передаче антиапоптотических сигналов ростовых факторов [73,74].

Такое же усиление передачи антиапоптотических цитокиновых сигналов наблюдается и при активации Ras- онкогена, наиболее частой мутации при опухолях человека. Эта мутация наблюдается, например, у 10-50% больных с миелодиспластическим синдромом, острым миелобластным лейкозом, ювенильным хроническим миелолейкозом [75,76,77]. Как отмечалось выше, активация Ras- онкогена запускает каскад сигнальных серин/треониновых киназ, одной из функций которых является активация антиапоптотических белков — продуктов семьи Bcl-2 генов.

Для клеток опухолей, как солидных, так и происходящих из лимфоидных и гемопоэтических клеток, характерно нарушение проведения классического проапоптотического цитокинового сигнала TGF- β , связанного с мутацией в гене рецептора этого цитокина [78].

Для опухолевой трансформации существенно также и еще одно событие, связанное с передачей цитокинового сигнала в клетке, — потеря активности клеточных фосфатаз, например МКР-1, ответственных за прекращение антиапоптотического сигнала [79,80].

Таким образом, ростовые факторы, имеющие решающее значение в регуляции программы клеточной смерти, играют ведущую роль и в опухолевой трансформации клетки.

2.9. Перспективы использования механизмов цитокиновой регуляции жизни клетки для подавления опухолевого роста

Ростовые факторы в последние годы находят все большее клиническое применение. В основном это связано с использованием их рекомбинантных форм для повышения клеточной продукции при иммунодефиците и депрессиях кроветворения различного генеза, для ускорения восстановления костномозгового кроветворения после пересадки костного мозга, с целью увеличения числа стволовых кроветворных клеток в донорском костном мозге и мобилизации их выхода из костного мозга в кровь.

Способность некоторых цитокинов усиливать противоопухолевый иммунный надзор и непосредственно тормозить опухолевый рост начали использовать в противоопухолевой терапии с середины 80-х годов.

IL-2 был использован первым для активации иммунных эффекторов в противоопухолевой терапии. Первый клинический протокол с использованием только IL-2 или IL-2 в сочетании с LAK (Lymphokine Activated Killer) клетками был разработан Rosenberg'ом с соавт. в 1985 г. [81]. Наибольшая эффективность этой иммунотерапии в сочетании с химиотерапией была получена при меланоме и раке почки, в значительно меньшей степени при злокачественных заболеваниях системы крови. Высокая токсичность и нестабильность эффекта ограничивают применение этого метода в настоящее время.

С целью индукции апоптоза в опухолевых клетках широко используется IFN- α при лечении многих солидных опухолей, лимфомы, миеломной болезни и хронического миелолейкоза [82]. Особенно перспективным явилось применение его рекомбинантной формы при хроническом миелолейкозе [83; 84]. Использование IFN- α в сочетании с моно- химиотерапией при лечении хронического миелолейкоза впервые привело к получению цитогенетической ремиссии, дальнейшие перспективы этой терапии изучаются.

Достижения последних лет — расшифровка структуры и функции цитокиновых рецепторов, процессов проведения и реализации цитокиновых сигналов — раскрыли механизмы участия цитокинов в программах, жизненно важных для клетки, в том числе, и в процессах опухолевой трансформации. Это дало возможность рассмотреть новые пути подавления опухолевого роста с использованием механизмов формирования и проведения цитокиновых сигналов. Основные направления представлены схематически на рис.2.4. Остановимся подробнее на некоторых из них.

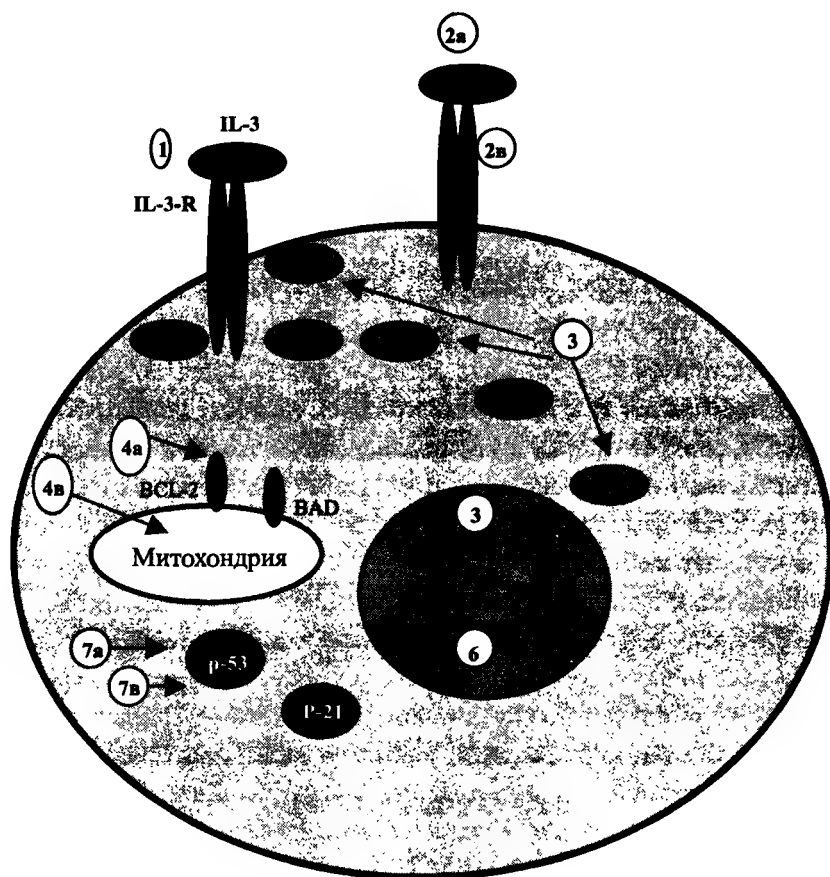
Как упоминалось выше, опухолевая трансформация гемопоэтических клеток может быть связана с аутокринной продукцией в опухолевых клетках цитокинов, стимулирующих пролиферацию, и/или экспрессию рецепторов к таким цитокинам. Одним из перспективных направлений подавления опухолевого роста может быть создание рекомбинантным путем химерных токсических цитокинов путем сшивки токсина *Diphtheria* или эндотоксина *Pseudomonas* с белком цитокинового гена. Такой химерный токсин-цитокин способен вызывать токсический лизис клеток опухоли специфически связываясь с рецептором соответствующего цитокина [85,86].

Возможно также подавление роста аутокринных опухолей с помощью моноклональных антител против продуцируемых этими клетками цитокинов, стимулирующих рост опухоли, и экспрессируемых к ним рецепторов [87,88]. Такая иммунотерапия должна сочетаться с использованием цитокиновых антагонистов и других ингибиторов проведения цитокиновых сигналов [89,90,91,92].

В настоящее время разрабатываются и способы подавления ключевых генов, вовлеченных в проведение и реализацию цитокиновых антиапоптотических сигналов.

Активация белка - продукта RAS гена происходит под воздействием ферментов protein farnesyl transferase (PFTase) и geranylgeranyl transferase (GGTase) [93]. Эти ферменты стали мишенью для нового класса лекарственных соединений, разрабатываемых разными фармацевтическими фирмами (см.табл.2.6). Многие из них успешно прошли доклиническую фазу испытаний, их использование в клинике — дело недалекого будущего.

Разработке новых препаратов, тормозящих опухолевый рост путем блокирования путей проведения цитокиновых сигналов, а также циклинзависимых киназ, обеспечивающих прохождение опухолевыми клетками митотического цикла, посвящены



1. Химерный белок токсин-цитокин
2. Антагонисты:
 - а. цитокина
 - в. цитокинового рецептора
3. Химические ингибиторы молекул, передающих сигналы.
4. Индукторы апоптоза:
 - а. антитела к Bcl-2
 - в. активаторы каспаз
5. Химиопрепараты, нарушающие синтез ДНК
6. Ионизирующая радиация
7. Модуляция гена Р-53:
 - а. Аденовирусное уничтожение Р53-мутанта
 - в. Аденовирусное введение гена 53 дикого типа

Рис.2.4. Методы подавления лейкемического роста. Объяснения в тексте

Табл.2.6. Разработка новых препаратов, тормозящих опухолевый рост

ПРЕПАРАТ	Направленность действия	ФИРМА	Клинический протокол
AG198, AG6450, Genistein, Herbimycin А и др.	Ингибиторы тирозин-киназ	MERK, ZENEKA, JANSSEN, SCHERING PLOUGH, ONCOGENE, PFIZER	ОЛЛ, ХМЛ, глиомы и различные солидные опухоли
Rapamycin Wortmannin	Тормозят прохождение цитокенинового сигнала	Parke-Davis	Лейкозы
Ингибиторы FТi GT (ферментов, активирующих RAS)	Тормозят активацию RAS, обеспечивающего ингибицию апоптоза в опухолевых клетках	Janssen Pharmaceutica, Schering Plough, Merck, Parke-Davis	
NK 1098P,RK682, CDK (ингибиторы циклин-зависимых киназ)	Нарушают прохождение клеточного цикла	Hoelst-Marion-Roussel	Миелома, тиреоидный рак
FK 506	Иммуносупрессия Цитокенинового рецептора	Merk	-
Антитела к BCL2	Стимуляция апоптоза	Genta Biotechnol.Corp	Солидные опухоли
Токсин, убивающий Р-53-мутант	Стимуляция апоптоза	Опых	Опухоли головы и шеи, рак яичников и поджелудочной железы.
Аденовирусный носитель гена Р-53 дикого типа	Стимуляция апоптоза	Conji, Schering Plough	Рак легких, яичников, печени

исследовательские разработки многих крупных фармацевтических фирм. Основные из них, находящиеся на стадии клинических испытаний, приведены в табл.2.6.

Таким образом, ростовые факторы, рецепторы к ним, молекулы, передающие цитокениновые сигналы и воспринимающие их гены — могут быть перспективными мишенями для противоопухолевой терапии.

Разработка этих новых путей противоопухолевой терапии стала возможна, благодаря достижениям последних лет в расшифровке механизмов, а также путей формирования и реализации цитокениновых сигналов в клетке.

Исследования в этой области открывают новые широкие перспективы в клиническом использовании цитокенинов и ростовых факторов.

Литература к очерку

1. Metcalf D. // Science, 1985, Vol.229, P.16-22
2. Clark S.C., Kamen R. // Science, 1987, Vol.236, P.1229-37
3. Sieff C.A. // J.Clin.Invest., 1987, Vol.79, P.1549-57
4. Carnot P., Deflandre C. // CR Hebd Acad Sci 1906, Vol.143, P.432-5
5. Pluznik D.H., Sachs L. // J.Cell Comp.Physiol. // 1965, Vol.66, P.319-24
6. Bradley T.R., Metcalf D. // Aust.J.Exp.Biol.Med., 1966, Vol.44, P.287-99
7. Bennet B., Bloom B. // Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1968, 59, 756
8. Kasakura S., Levenstein L. // J.Immunol., 1970, 105, 1162
9. Bloom B., Bennet B. // Science, 1966, 153, 180
10. Dumonde D., Wolstencroft R. E.a. // Nature, 1969, 224, 38
11. Waksman B.H. In Biology of lymphokines, N.-J., 1979, p.585
12. Das S.k., Stenley E.R. e.a. // Blood, 1981, 58, 630-41
13. Kawasaki E., Ladner M. e.a. // Science, 1985, 230, 291-6
14. Yang Y., Ciarletta A. e.a. // Cell, 1986, 47, 3-10
15. Aarden L., e.a. // J/Immunol., 1979, 123, 2928
16. Paul W., Kishimoto T. E.a. // Clin.Exp.Immunol., 1992, 88, 367
17. Hudak S., e.a. // Blood, 1995, 85, 2747-50
18. Brandt J., e.a. // Blood, 1992, 79, 634-8
19. Van Snick J., e.a. // Ann.Rev.Immunol., 1990, 8, 253-60
20. Metcalf D. // Blood, 1995, 86, 3515-19
21. Krantz S. // Blood, 1991, 77, 419-22
22. Demetri G., Griffin J. // Blood, 1991, 78, 2791-94
23. Keller J., e.a. // J.Exp.Med., 1988, 168, 737-41
24. Graham G., Pragnell I. // Dev.Biol., 1992, 151, 377-82
25. Smithgall T.e. // Pharmacol.Rew., 1998, 50, 1-19
26. Dinarello Ch. // Cytokine and Growth Factor Rev., 1998, 8, 353-265
27. Johnson L.N., Noble M., Owen D. // Clll, 1996, 85, 149-158
28. Ogawa M., Matsuzaki Y. E.a. // J.Exp.Med., 1991, 174, 63-71
29. Yoshida H., Hayashi S., e.a. // Nature, 1990, 345, 442-444
30. Hibi M., Nakajima K., Hirano T. // J.Mol.Med., 1996, 74, 1-12
31. Sato N., Sakamaki K., e.a. // TMBO J., 1993, 12, 4181-4189
32. Taga N., Kishimoto T. // Curr.Opin.Immunol., 1995, 7, 17-23
33. Sugamura K., Asao H., e.a. // Fnn.Rev.Immunol., 1996, 14, 179-205
34. Wells J.A., de Vos A.M. // 1996, 65, 609-634
35. Gurniak C.B., Berg L.J. // Blood, 1996, 87, 3151-3160
36. Thomis D.C., Gurniak C.B., e.a. // Science, 1995, 270, 794-797
37. Burton E.A., Hunter S., e.a. // J.Biol.Chem., 1997, 272, 16189-95
38. Tilbrook P.A., Ingley E., e.a. // EMBO J., 16, 1610-1619
39. Roebroek A.J., Schalken J.A., e.a. // EMBO J., 1985, 4, 2897-2903
40. Matsuda T., Fukada T., e.a. // J.Biol.Chem., 1995, 270, 11037-11039
41. Mano H., Yamashita Y., e.a. // FASEB J., 1996, 10, 637-642
42. Rawlings D.J., Witte O.N. // Semin.Immunol., 1995, 7, 237-246
43. Matsuda T., Takahashi-Tezuka M., e.a. // Blood, 1995, 85, 627-633
44. Bolen J.B. // Curr.Opin.Immunol., 1995, 7, 306-311

45. Corey S.J., Burkhardt A.L., e.a. // *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, 91, 4683-4687
46. Lin J.-X., Leonard W.J. // *Cytokine and Growth Factor*, 1997, 8, 313-332
47. Horvath C.M., Darnell J.E. // *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1997, 9, 233-239
48. Tonks N.K., Neel B.G. // *Cell*, 1996, 87, 365-368
49. Jaken S. // *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1996, 8, 168-173
50. Newton A.C. // *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 28495-28458
51. Tenen D., e.a. // *Blood*, 1997, 90, 489-519
52. Tenen D.G. // *Congress EHA, Educational book*, 2000, 169-177
53. Testa U., e.a. // *Blood*, 1996, 88, 3391-96
54. Metcalf D. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1999, 872, 287-304
55. Basch R., Zhang X.-M., e.a. // *Br. J. Haematol.*, 1999, 105, 1044-1054
56. Faibarine L., e.a. // *Cell*, 1993, 74, 823-825
57. Rodel J.E., Link D.C. // *Blood*, 1996, 87, 858-861
58. Brandt J.E., e.a. // *Dlood*, 1994, 83, 1507-1511
59. Владимирская Е.Б., Масчан А.А., Румянцев А.Г. // *Гематол. и трансфузиол.*, 1997, 5, 4-9
60. Hu X., Zuckerman K. // *Leukemia and Lymphoma*, 2000, 38, 235-246
61. Ray C.A., Black R.A., e.a. // *Cell*, 1992, 69, 597-604
62. Thompson C., Gajewsky T. // *Cell*, 1996, 87, 587-592
63. McCubrey J.A., Stratford May W., e.a. // *Leukemia*, 2000, 14, 9-21
64. Hoffman B., Lieberman D. // *Oncogene*, 1994, 9, 1807-1811
65. Владимирская Е.Б., Румянцев А.Г. *Гематол. и трансфузиол.* // 1991, 1, 8-12.
66. Murohashi I., Nagata K., e.a. // *Cancer Res.*, 1988, 48, 6424
67. Young D., Demetri G., e.a. // *Exp. Hematol.* 1988, 16, 378
68. Horikoshi A., Sawada Sh., e.a. // *Leukemia Res.*, 1995, 19, 195-201
69. Inukai N., Sugita K., e.a. // *Leukemia*, 1998, 12, 382-389
70. Cortes J., Ruzrock R. // *Leukemia and Lymphoma*, 1997, 26, 251-259
71. Н.Н. Тупицын // *Современная онкология*, 1999, 1, 4-8
72. Tupitsyn N., Kadagidze Z., e.a. // *Clin. Lab. Haem.*, 1998, 20, 345-352
73. Kim S., Im Y., Markowitz S., Bang Y. // *Cytokine Growth Factor*, 2000, 11, 159-168
74. Kantarjian H., Diesseroth F., Kurzrock R., e.a. // *Dlood*, 1993, 82, 691-696
75. Rellihier M., Knott A., McLaughlin J., e.a. // *Mol. Cell Biol.*, 1991, 11, 4710-4712
76. Neubauer A., Greenberg P., e.a. // *Leukemia*, 1994, 8, 638-641
77. Flotho C., Valcamonica S., e.a. // *Leukemia*, 1999, 13, 32-37
78. Cline M., Jat P., e.a. // *Leuk Lymphoma*, 1992, 7, 283-287
79. Loda M., Capodiceci P., e.a. // *Am. J. Pathol.*, 1996, 149, 1553-1564
80. Magi-Galluzzi C., Mishra R., e.a. // *Lab. Invest.*, 1997, 76, 37-51
81. Rosenberg S., Lotze M., Muul L., e.a. // *N. Engl. J. Med.*, 1985, 313, 1485
82. Fridman W., Tartour E. // *Molecular aspects of medicine*, 1997, 18, 1-90
83. Tolpaz M., e.a. // *Blood*, 1987, 69, 1280-1288
84. Kantarjian H.M., O'Brien S., e.a. // *J. Am. Soc. Hematol.*, 1996, 87, 3069-3087
85. Rozemuller H., Rombouts E., e.a. // *Leukemia*, 1998, 12, 710-718
86. Pai I.h., Pastan I. // *Curr. Top. Micro. Immun.*, 1998, 234, 83-96
87. Roush W. // *Science*, 1997, 278, 1039-1040
88. Rogers S., Bradbury D., e.a. // *Exp. Hematol.*, 1994, 22, 593-598
89. Lopez A., Shannon M., e.a. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 842-846
90. Iversen P.O., Rodwell R., e.a. // *Dlood*, 1996, 88, 2634-2639.

91. Janson C.H. // Med. Oncol. Tum. Pharmacother., 1993, 10, 21-23
92. Sun Q., Woodcock J., e.a. // Blood, 1996, 87, 83-92
93. Hill B., Perrin D., Kruczynski A. // Critical Rev. in Oncology/ Hematology, 2000, 33, 7-23.

Резистентность опухолевых клеток к химиотерапии при онкогематологических заболеваниях



Успехи последних двух десятилетий в терапии злокачественных заболеваний, особенно острых лейкозов и лимфом у детей, связаны с введением высоко агрессивной программной полихимиотерапии. Детально разработанные программы, включающие адекватную сопроводительную терапию, направленную на борьбу с высокой токсичностью лечения, привели к изменению патоморфоза^[1] и течения этих заболеваний: в настоящее время при остром лимфобластном лейкозе выздоравливает 70-75%, при остром миелобластном лейкозе — 40-50% детей, а при неходжкинской лимфоме бессобытийная выживаемость у детей составляет более 75%^[2,3,4].

Как показывает анализ причин неэффективности программной полихимиотерапии при острых лейкозах и лимфомах у детей, смерть, связанная с осложнениями агрессивной химиотерапии и неадекватностью сопроводительного лечения, наступает примерно в трети таких случаев, неуспех лечения в остальных обусловлен первичной и вторичной резистентностью опухолевых клеток к химиотерапии^[5].

Таким образом, резистентность опухолевых клеток к химиотерапии является ведущей причиной неэффективности современных методов программного лечения, а преодоление лекарственной резистентности опухолевых клеток — основной резерв повышения результативности терапии, направленной на максимальную санацию организма от опухолевых клеток.

Первичная и вторичная резистентность опухолевых клеток к химиотерапии — процессы многофакторные, сложные, зависящие как от индивидуальных особенностей циторедуктивного действия препаратов, так и от биологических свойств самих опухолевых клеток. Анализ этих процессов необходим для понимания путей и разработки методов преодоления лекарственной резистентности клеток опухоли к терапии.

Для понимания причин лекарственной резистентности опухолевых клеток необходим анализ условий реализации цитотоксического действия химиотерапии.

Перечень этих условий приведен в табл. 3.1.

Табл 3.1. Условия реализации цитотоксического действия химиопрепаратов.

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Проникновение в клетку. • Наличие внутриклеточных мишеней для действия препарата. • Внутриклеточная трансформация в активную форму. • Достижение адекватной внутриклеточной концентрации. • Способность клетки к апоптозу. |
|--|

У каждого цитостатического препарата имеются свои механизмы и приоритеты в реализации киллерной функции.

Целью этого очерка является анализ общих механизмов взаимодействия антилейкемических препаратов с биологическими структурами опухолевых клеток и поиск ключевых моментов этого взаимодействия, нарушения в которых делают невозможным осуществление цитотоксической функции химиотерапии.

Остановимся последовательно на каждом условии реализации цитотоксического эффекта.

3.1. Проникновение препарата в опухолевую клетку

Существуют следующие механизмы поступления препаратов в опухолевые клетки:

- Пассивная диффузия;
- Использование специфических носителей;
- Использование высокоафинных рецепторов.

Каждый препарат имеет свои приоритетные пути поступления, некоторые пользуются одновременно всеми. Так, Метотрексат (МТХ) использует все вышеперечисленные пути проникновения в клетку^[6]. Однако пассивная диффузия выражена в большей степени при создании высокой экстраклеточной концентрации путем введения больших доз МТХ, например, детям с вновь диагностированным В-ОЛЛ. При использовании средних доз или длительном введении высоких доз преимущественными путями проникновения МТХ в лейкемические клетки является соединение с носителем- фолатом и/или со специфическим рецептором^[7]. Снижение активности последних нередко обуславливает резистентность лейкемических клеток к МТХ в рецидиве ОЛЛ и при манифестации Т-ОЛЛ.

3.2. Наличие внутриклеточных мишеней для действия препаратов.

Для реализации цитотоксического действия препарата необходимо наличие в опухолевой клетке мишени для его действия. Так, например, для МТХ такой мишенью является фермент дегидрофолатредуктаза, участвующий в синтезе нуклеотидов и аминокислот, необходимых для образования белка и ДНК. При редукции этого фермента под действием активной формы МТХ опухолевая клетка теряет способность к репарации ДНК и погибает ^[8]. Однако в некоторых опухолевых клетках, например, при ОМЛ для репарации ДНК и белка могут использоваться другие метаболические пути, их характеризует низкий уровень фермента дегидрофолатредуктазы, с чем может быть связана резистентность таких клеток к МТХ ^[9].

Некоторые антилейкемические препараты (этопозид, тенипозид, антрациклины, амасакрин, митоксантрон) осуществляют свой цитотоксический эффект через подавление внутриядерных энзимов Топоизомеразы-1 и 2 (Торо-1 и 2). Эти энзимы следят за правильным пространственным расположением ДНК: Торо-1 контролирует начало репликации ДНК, Торо-2 — завершение репликации и окончательное оформление структуры и топологии вновь образованной ДНК ^[10]. Медикаментозная ингибция этих энзимов в клетках с их высокой экспрессией ведет к быстрой апоптотической гибели клеток ^[11]. Подавление или модуляция активности топоизомераз — частый феномен в лейкемических клетках, особенно в рецидиве заболевания. Теоретически это является основанием для развития резистентности к вышеперечисленным химиопрепаратам. В настоящее время доказана связь резистентности к терапии этопозидом и антрациклинами при ОМЛ с низким содержанием Торо-2 в лейкемических клетках этих больных, подобной корреляции при ОЛЛ и НХЛ получить не удалось ^[12].

3.3. Внутриклеточная трансформация в активную форму

Многие химиопрепараты для реализации цитотоксического эффекта нуждаются во внутриклеточной активации. Нарушения в этих механизмах обуславливает их неэффективность. Рассмотрим это на нескольких примерах. На рис.3.1 приведены события, превращающие МТХ в активную форму - Метотрексатполиглутамат (МТХРГ). Это происходит под действием внутриклеточного фермента фолиополiglутамат синтетазы (FPGS), другой лизосомальный фермент — гаммаглутамат-гидролаза (GGH) — обладает противоположным действием, расщепляя МТХРГ ^[13]. Первичная резистентность лейкемических клеток при ОМЛ к МТХ обусловлена сочетанным метаболическим дефектом опухолевых клеток: снижение активности FPGS и повышение активности GGH ^[14]. Происхождение вторичной резистентности к МТХ у лейкемических клеток в рецидиве ОЛЛ другое — резкая активация

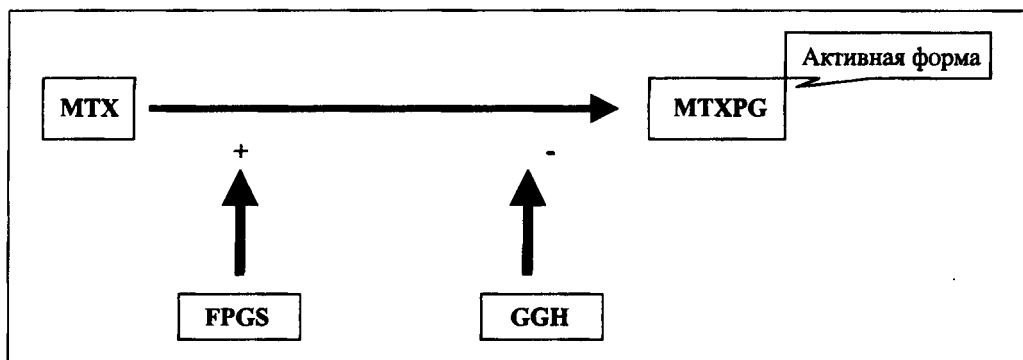


Рис. 3.1. Внутриклеточная трансформация метотрексата в активную форму.

MTX	-	метотрексат
MTXPG	-	метотрексатполиглутамат (активная форма)
FPGS	-	фолиополиглутамат синтетаза (фермент)
GGH	-	гаммаглутаматгидролаза (фермент)

фермента GGH^[7]. Исходя из этих данных, представляется актуальным поиск новых антифолатов, не зависящих в своем действии от дефектов метаболизма MTXPG.

Антагонисты пуриновых оснований (6-меркаптопурин и тиогуанин) также требуют внутриклеточной активации. Этот процесс представлен схематически на рис.3.2.

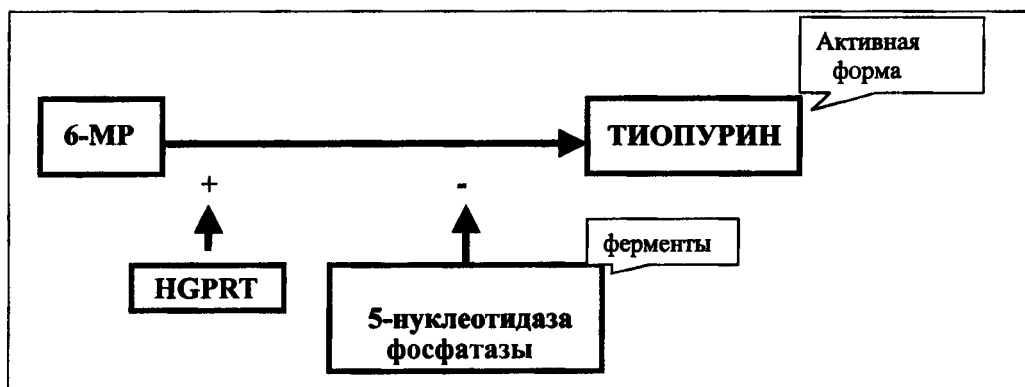


Рис. 3.2 Внутриклеточная трансформация 6-МР в активную форму

6-МР	-	6-меркаптопурин
HGPRT	-	гипоксантил гуанин фосфорибозил трансфераза (фермент)

Перевод 6-МР и тиогуанина в активную форму происходит под действием внутриклеточного фермента гипоксантил-гуанин-фосфорибозилтрансфераза (HGPRT), ингибируют этот переход ферменты: фосфатазы и 5-нуклеотидаза.

Резистентность к 6-МР при ОЛЛ связана с высокой активностью внутриклеточных ферментов 5-нуклеотидазы и фосфатазы, но не с понижением активности HGPRT^[15].

3.4. Достижение адекватной внутриклеточной концентрации

Феномен множественной лекарственной резистентности (MDR)- перекрестной рефрактерности клеток опухоли к различным химиопрепаратам, в основном, растительного происхождения (антрациклины, алкалоиды *vinca rosea*, эпиподофилотоксины), изучен достаточно подробно в эксперименте на опухолевых клеточных линиях [16,17,18]. Установлено, что в основе развития этого феномена лежит резкое снижение внутриклеточной концентрации препаратов за счет выведения их из клетки с помощью специальных транспортных белков, работающих в режиме «выкачивающей помпы». К таким белкам относятся: Р-гликопротеин (Р-gr), раньше и лучше всех изученный транспортный белок [19]; белок множественной лекарственной резистентности (MRP) [20]; белок легочной резистентности (LRP), впервые выделенный из клеточных линий не-мелкоклеточного рака легкого, не содержащих Р-gr и MRP [21]. При исследованиях, проведенных на клеточных линиях, было показано, что синтез этих белков кодируется соответствующими генами: Р-gr является продуктом MDR-1 — гена, локализованного на 7 хромосоме, гены кодирующие MRP и LRP, располагаются на 16 хромосоме, в регионах p13.1 и p11.2 соответственно [22].

Были разработаны способы молекулярно-генетического определения содержания белков лекарственной резистентности [23], позволившие изучать и модулировать их активность. Так, были идентифицированы препараты, способные блокировать активность белков лекарственной резистентности и повышать внутриклеточную концентрацию цитостатиков, они получили название «хемосинтетайзеры» [23,24]. В таблице 3.2 перечислены основные хемосинтетайзеры, используемые для блокирования тех или иных транспортных белков.

Таблица 3.2. Хемосинтетайзеры

Хемосинтетайзеры	P-GR	LRP	MRP
Верапамил	+	-	-
Циклоспорин А	+	-	-
PSC 833	+	-	-
Бутатионин	-	-	+
Генистенин	-	+	+
BIBW-22	+	+	-
VX710	+	?	+

Из приведенных в табл. 3.2 препаратов только первые два (Циклоспорин-А и Верапамил) находят пока клиническое применение [25]. Использовать хемосинтетайзеры в клинике следует с большой осторожностью, т.к. функция рассмотренных выше транспортных белков является общебиологическим феноменом, они экспрессированы

в норме во многих клеточных системах, участвующих в выведении токсических продуктов из организма (клетки печени, почек, кишечного эпителия и др.), подавление их активности в этих системах может явиться серьезным осложнением такой терапии.

Многочисленные данные о структуре и функции белков MDR получены, в основном, в эксперименте, сведения об их роли в формировании первичной и вторичной рефрактерности к терапии лейкозов и лимфом в клинике, особенно у детей, немногочисленны и противоречивы. Особого внимания заслуживает публикация^[26] кооперативного исследования отдела детской гематологии/онкологии Университетского госпиталя Врийе (Нидерланды), группы COALL (Гамбург, Германия), группы ALL-Rez BFM (Берлин, Германия), группы AML-BFM (Мюнстер, Германия). Было изучено клиническое и прогностическое значение экспрессии P-gp, MRP и LRP у 141 ребенка с ОЛЛ и 27 детей с ОМЛ. Сравнивали внутриклеточное содержание этих белков в острой фазе и рецидиве, при разных формах острого лейкоза, изучали его корреляцию с клиническими факторами риска и тестом цитотоксичности *ex vivo*. Проведенные исследования убедительно доказывают отсутствие значения белков P-gp и MRP в развитии лекарственной резистентности при острых лейкозах у детей. Белок LRP, по-видимому, участвует в формировании некоторых форм лекарственной резистентности у детей: его экспрессия была выше при ОМЛ, по сравнению с ОЛЛ, в рецидивах выше, чем в острой фазе; была выявлена значимая обратная корреляционная связь с чувствительностью к даунорубину.

Таким образом, исследования последнего времени позволяют считать несколько преувеличенной установленную ранее в эксперименте роль белков MDR в формировании лекарственной резистентности, по крайней мере, при острых лейкозах у детей.

3.5. Способность клеток к апоптозу

Реализация циторедуктивного эффекта химиотерапевтических средств, независимо от конкретных механизмов их действия, происходит чаще всего через активацию в опухолевых клетках программы апоптоза^[23].

С этой точки зрения, резистентность опухолевых клеток к терапии может быть следствием двух процессов: неспособности химиопрепарата запустить программу апоптоза (недостаточная внутриклеточная концентрация активной формы препарата и/или отсутствие внутриклеточных мишеней, воспринимающих действие препарата и включающих программу апоптоза) и нарушения в механизмах апоптоза в опухолевых клетках.

В предыдущих разделах мы рассматривали первую группу причин, в настоящем разделе остановимся на второй.

Апоптоз - это физиологическая клеточная смерть, происходящая путем самопереваривания. Программа апоптоза может быть включена множеством внешних и внутренних сигналов и направлена на освобождение от старых или наработанных в излишке клеток.

Схематический путь апоптоза представлен на рис.1.4. в очерке, посвященном апоптозу.

Способность к спонтанному апоптозу лейкемических клеток *ex vivo* коррелирует с их лекарственной чувствительностью [24].

Определение уровня способности к спонтанному апоптозу лейкемических клеток при ОМЛ является хорошим тестом чувствительности клеток к химиотерапии [25].

Как показали исследования последних лет, противоопухолевые химиопрепараты включают апоптоз, в основном, через две сигнальные системы: ген Р-53 и FAS-R/TNF.

Нормальная функция гена Р-53, как подробно рассматривалось в очерке «Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста», связана с арестом клеток в G-1 фазе и индукцией апоптоза в ответ на повреждение ДНК и радиацию. Антиметаболиты (6-меркаптопурин, метотрексат) и химиопрепараты, мишенью для действия которых являются топоизомеразы (этопозид, тенипозид) вызывают апоптоз опухолевых клеток через активацию Р-53 [26,27,28].

Однако повреждение ДНК цитотоксическими агентами может найти свою реализацию и в обход Р53 гена [29] (см.рис 3.3).

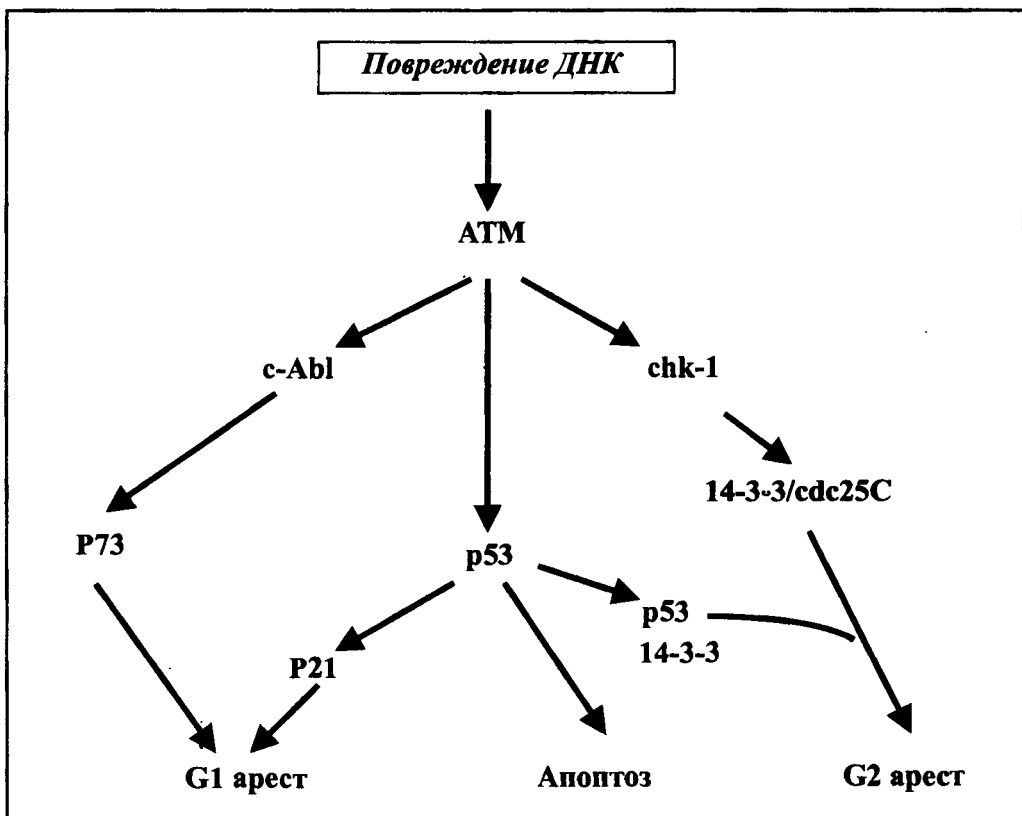


Рис.3.3. Схематический путь апоптоза при повреждении ДНК

Дело в том, что повреждение ДНК цитотоксическими агентами вызывает активацию атаксия-телеангиоэктазия-мутировавшего протеина (АТМ), у которого имеется 3 мишени действия, ген Р53 только одна из них. Две другие (продукты онкогенов *c-abl* и *chk-1*) ответственны за остановку клеток в фазах G1 и G2 с возможной последующей репарацией повреждения ДНК. Компоненты активации этих путей рассматриваются как возможные мишени для разработки новых лекарственных средств, усиливающих противоопухолевую активность агентов, повреждающих ДНК [30].

Как представлено на схеме (см.рис.3.3), при прохождении сигнала повреждения ДНК только ген Р53 отвечает за развития апоптоза.

В процессе опухолевой трансформации нередко происходит мутация в гене Р-53, отменяющая его проапоптотическую функцию [31]. Обычно эта мутация сопровождается делецией 17р хромосомы, где картирован ген Р-53 [32]. Такая трансформация делает опухолевую клетку невосприимчивой к ДНК-токсическим препаратам. Мутация Р-53 гена чаще наблюдается в солидных опухолях (рак толстой кишки, простаты), реже при лейкозах и лимфомах, но всегда сопровождается лекарственной резистентностью и характеризуется плохим прогнозом. Так, при исследовании 330 детей с ОЛЛ мутация в Р-53 была обнаружена при постановке диагноза всего у 10 детей (<3%) [33]. Все эти больные отличались первичной лекарственной резистентностью — недостижимостью ремиссии или развитием рецидива в первые 6 месяцев ремиссии. У первичных больных с ОМЛ мутация Р-53 наблюдалась в 16,7% и также сопровождалась плохим прогнозом [34]. Невосприимчивость к терапии при мутации в гене Р-53 отмечалась и у детей с В-клеточной лимфомой [35]. Отмена проапоптотического действия Р-53 происходит не только в результате мутации, но также и при одновременном введении химиопрепаратов и ростовых факторов (GM-CSF, G-CSF) [36], что следует учитывать в клинической практике.

Химиотерапия и облучение нередко повреждает и здоровые ткани, используя тот же, опосредованный через Р-53 механизм действия, и это становится особенно опасным при мутации Р53 в опухолевых клетках. Предложен новый препарат - *pifithrin-α*, инъекция которого в эксперименте способна временно и обратимо блокировать ген Р53 в нормальных тканях, что позволяет дать высокую химиотерапевтическую и лучевую нагрузку в случаях Р53-дефицитной опухоли [37].

Другим клеточным регионом, воспринимающим проапоптотические сигналы противоопухолевой терапии, является поверхностный FAS-R, являющийся членом семьи TNF-рецепторов, получившей название «региона смерти» [38]. Было показано, что некоторые химиопрепараты (доксорубин, цитарабин, метотрексат, этопозид и цисплатин) в терапевтических концентрациях стимулируют в опухолевых клетках синтез FAS-лиганда, соединяющегося с FAS-R и таким образом аутокринно включающими проапоптотическую функцию «региона смерти» [39]. Это доказывается тем, что блокада FAS-R и FAS-L в опухолевых клеточных линиях вызывает их резистентность, например, к антрациклам.

Активация рецепторов региона клеточной смерти, кроме индукции апоптоза, вызывает синтез нуклеарного фактора каппа В (NF- κ B), обладающего провоспалительными и антиапоптотическими свойствами (см.рис.1.7). Экспериментальные исследования показали, что нейтрализация этого белка повышает чувствительность опухолевых клеток к проапоптотическому действию TNF α и ряда противоопухолевых средств^[40]. С другой стороны, NF- κ B обладает способностью трансаktivировать FAS-L в ответ на действие некоторых противоопухолевых препаратов, инициируя упомянутый ранее аутокринный механизм клеточной смерти^[41].

Резистентность опухолевых клеток к химиопрепаратам, действующим через «регион клеточной смерти» связана с редукцией/потерей экстрацеллюлярной части FAS-R или мутацией в его цитоплазматическом домене^[42]. У опухолевых клеток, резистентных к FAS-индуцированному апоптозу, отмечается и низкая чувствительность к лимфокин-активированным киллерным лимфоцитам^[43]. Восстановление апоптотической функции FAS-R в эксперименте может быть достигнуто действием химиопрепаратов в сочетании с FAS-L, а также введением TNF α . Однако эти способы очень токсичны для клеток печени и не могут быть рекомендованы для применения в клинике^[44]. Так же эффективно, но нетоксично для нормальных клеток восстанавливает функцию FAS-R в эксперименте и культуре опухолевых клеток другой лиганд этого региона, аналог TNF α , - TRAIL или Apo-2-лиганд^[45]. Этот препарат имеет хорошие перспективы для использования в клинике.

Ключевые позиции в регуляции апоптоза занимает семья Bcl-2-генов, включающая в себя как про-, так и антиапоптотические гены (см.рис.1.5). Экспрессия этих генов часто бывает нарушена в опухолевых клетках, в том числе при лейкозах и лимфомах. Первый идентифицированный член этой семьи - Bcl-2 ген был выявлен при хромосомной транслокации t(14;18) у больных с В-клеточной не-Ходжкинской лимфомой, с его активацией была связана способность опухолевых клеток к переживанию^[46,47]. В дальнейшем повышенная экспрессия гена Bcl-2 была обнаружена при многих опухолях и без типичной хромосомной транслокации. Многочисленные эксперименты убедительно доказали, что повышение экспрессии Bcl-2 гена вызывает рефрактерность опухолевых клеток к широкому спектру химиопрепаратов, в то время, как подавление его активности снимает лекарственную резистентность клеток опухоли^[48]. Инактивация BCL-2 может быть достигнута и с помощью препаратов, действующих на микротубулярный аппарат клетки, вызывающих его полнмеризацию (препараты барвинка розового) или препятствующих деполимеризации микротрубочек (таксаны)^[49]. Препараты, повреждающие ДНК, не снижают активность Bcl-2-гена, а следовательно, не показаны в случаях резистентности, связанной с его повышенной экспрессией.

Другим важным для реализации программы апоптоза белком является продукт PML-гена. Этот белок модулирует как каспаз-зависимые, так и каспаз-независимые пути апоптоза, и потому его можно считать одной из центральных фигур апоптоти-

ческого каскада ^[50]. Экспрессия этого гена повышается под действием интерферонов и цитотоксических агентов, что подтверждает значение его и в реализации проапоптотической программы противоопухолевой химиотерапии ^[51]. Необходимым условием осуществления проапоптотической функции PML-белка является локализация его в специфических “крапчатых” ядерных структурах, получивших название “ядерных телец” (NB). При остром промиелоцитарном лейкозе (ОПЛ) в результате транслокации t(15;17) происходит слияние гена PML с геном RARA, кодирующего α -рецептор ретиноевой кислоты. Результатом этого слияния являются следующие события, приводящие к образованию опухолевого клона, резистентного к стандартной химиотерапии ^[52,53]:

- выход PML-белка из региона NB и потеря его проапоптотической функции;
- блокада синтеза ретиноевой кислоты, необходимой для дифференцировки клеток, в результате связывания химерным продуктом путей передачи транскрипционного сигнала гена ретиноевой кислоты.

Таким образом, особенностью патогенеза ОПЛ является сочетание торможения дифференцировки с блокированием апоптоза в клетках опухолевого клона. Значение ретиноевой кислоты и триоксида мышьяка в индукции ремиссии при ОПЛ связано с тем, что первый препарат вызывает клеточную дифференцировку, а второй - апоптоз, восстанавливая нормальную локализацию PML-белка в NB.

Торможение способности опухолевых клеток к апоптозу и связанная с этим резистентность к терапии может быть обусловлена нарушением в эффекторных механизмах апоптоза.

Образование активных форм кислорода (ROS) в некоторых клеточных системах является пусковым механизмом апоптоза, связанным с индукцией FAS/TNF региона ^[54]. Проапоптотическое действие некоторых алкилирующих агентов (АА), таких, как циклофосфан, лейкеран, мелфалан, обусловлено повышенным образованием ROS. Увеличение содержания в опухолевой клетке Глутатиона (GSH) приводит к нейтрализации свободнорадикальных эффекторов апоптоза. Кроме того, GSH может соединяться с самими алкилирующими агентами, при этом образовавшийся комплекс подвергается разрушению ферментом глутатионтрансферазой (GST) или выводится из клетки белком MRP. Таким образом, повышение содержания глутатиона в опухолевых клетках может явиться причиной их рефрактерности к алкилирующим соединениям ^[55]. Механизм развития такой резистентности представлен на рис.3.4. Как видно из данных, представленных на рисунке, цитотоксический эффект АА может быть потенцирован применением ингибиторов глутатионтрансферазы (GST), таких, как индомитозин (IND), и ингибиторов синтеза GSH, например, бутионина сульфоксимины (BSO). Получены данные, подтверждающие клиническое значение Глутатиона в развитии лекарственной резистентности при острых лейкозах у детей ^[56].

При исследовании 62 детей с ОЛЛ и 13 детей с ОМЛ было показано, что повышенное содержание в лейкоэмических клетках GSH сопряжено с повышенным

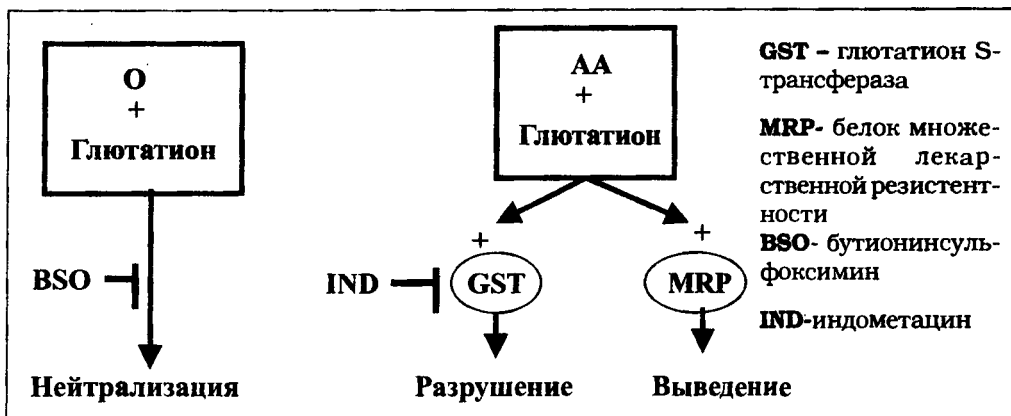


Рис.3.4. Резистентность к алкилирующим агентам (AA)

риском развития рецидива. При этом было выявлено что уровень GSH выше в бластах при ОМЛ, по сравнению с ОЛЛ, а при Т-ОЛЛ выше, чем при В-ОЛЛ. Таким образом уровень содержания GSH в лейкоэмических клетках может стать самостоятельным прогностическим фактором и быть использованным для индивидуального подбора оптимальной терапии.

Противоопухолевые препараты и облучение, наряду со специфическим воздействием, например, повреждением ДНК, одновременно активируют различные, в том числе липид-зависимые, сигнальные пути, модулирующие чувствительность клеток к химиопрепаратам. Удобнее всего это продемонстрировать на наиболее изученном сфингомиелин-церамидном пути, который активируется уже через несколько минут после воздействия препаратов на клетку^[57] (см.рис.3.5).

Сфингомиелин является структурным элементом клеточной мембраны. Многие химиопрепараты, включая даунорубицин, митоксантрон, этопозид, винкристин, дексаметазон, цитозар и другие, активируют в лейкоэмических клетках сфингомиелазу, вызывающую гидролиз сфингомиелина с образованием церамида. Церамид, в свою очередь, через каскад стресс-активированных протеин киназ, представителем которых является киназа JNK1, стимулирует апоптоз. Многие противоопухолевые препараты и цитокины, например, $TNF\alpha$, параллельно с образованием церамида, стимулируют запуск другого протеин-киназного каскада (диацилглицероль, протеин киназу C), ингибирующего запуск церамид- индуцированного апоптоза. Выявление конкурирующих путей воздействия химиопрепаратов на опухолевые клетки открывает новые возможности повышения их проапоптотической активности. Так, например, нейтрализация онкогена c-abl, ускоряющего образование диацилглицероля, делает клетки более чувствительными к киллерному эффекту химиотерапии^[58].

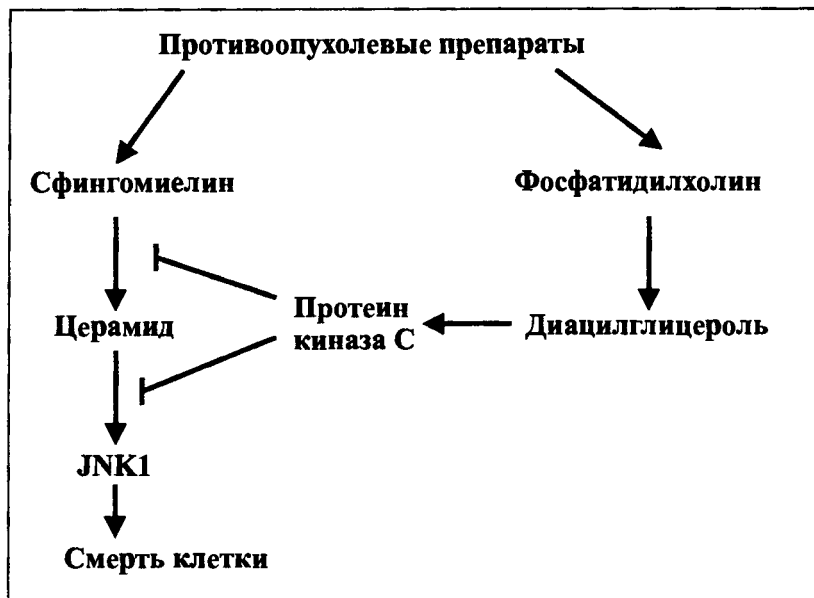


Рис.3.5. Механизм действия противоопухолевых препаратов на мембрану клеток

3.6. Пути преодоления лекарственной резистентности

Знание механизмов реализации цитотоксического действия химиотерапии и причин развития лекарственной резистентности опухолевых клеток делает возможным развитие методов, направленных на борьбу с ней. При этом могут быть намечены следующие пути преодоления лекарственной резистентности:

- Синтез новых противоопухолевых препаратов
- Медикаментозное снижение активности внутриклеточных белков и ферментов, блокирующих активность препаратов
- Коррекция генетических механизмов апоптоза
- Индивидуализация терапии на основе тестирования циторедуктивного эффекта *ex vivo*

Первые два направления освещались в процессе анализа причин лекарственной резистентности. Последние два направления представляют новую стратегию противоопухолевой терапии, ориентированной на апоптоз.

Модуляция чувствительности опухолевых клеток к химиотерапии, медикаментозное снятие лекарственной резистентности — новое перспективное направление противоопухолевой, в первую очередь антилейкемической терапии. Можно надеяться, что широкая клиническая реализация этого направления — дело недалекого будущего.

Однако уже сегодня можно осуществлять индивидуальный подбор наиболее эффективных антилейкемических средств с использованием теста цитотоксичности *ex vivo*. Наиболее удачным и хорошо разработанным является МТТ-тест^[59, 60]. С помощью этого теста определяется чувствительность лейкемических клеток к цитотоксическому действию отдельных химиопрепаратов при их совместном кратковременном культивировании. Использование этого теста в течение последних пяти лет и корреляция полученных данных с эффективностью терапии показала его высокую прогностическую ценность и возможность проспективного использования для индивидуального подбора эффективной терапии^[61, 62].

Таким образом, анализ причин лекарственной резистентности при онкогематологических заболеваниях открывает новые пути повышения эффективности терапии без усиления ее интенсивности.

Литература к очерку

1. Кисляк Н.С., Ленская Р.В. // Клетки крови у детей в норме и патологии. - М. - 1978. - С.256
2. Румянцев А.Г., Владимирская Е.Б., Кисляк Н.С. и др. // Педиатрия. - 1997. - 4. - С.4-9
3. Чернов В.М., Погорелова Э.И., Лескова С.Г. и др. // Гематол. трансфузиол. - 1997. - №5. - С.4-10
4. Самочатова Е.В., Асланян К.С., Беликова Л.Ю. и др. // Педиатрия. - 1997. - 4. - С.24-29
5. Румянцев С.А. // Причины смерти детей с острыми лейкозами и лимфомами при применении программной полихимиотерапии. - Автореф. канд. дисс. - 1997
6. Evans W. // Leukemia. - 1998. - Vol.12. - P.261. Abstr
7. Synold T., Relling M., Boyett J., et al // J Clin Invest. - 1994. - 94. - 1996-2001
8. Goldman I.D., Matherly L.H., Pharm. Ther., 1985 28, 77-102/
9. Dalton W. // Sem Hemat. - 1997/ - V.34. - P.3-9
10. Withoff S.D., De Jong S., De Vries E.G., et al // Anticancer Res. - 1996. - Vol.16. - P.1867-1880
11. Shimizu T., Pommier Y // Exp Cell Res. - 1996. - Vol.226. - P.292-301
12. Valkov N., Sullivan D. // Sem Hematol. - 1997. - Vol.34. - P.48-62
13. Masson E., Relling M., Synold T., et al // J. Clin. Invest. - 1996. - Vol.97. - P.73-80
14. Gorlick R., Goker E., Trippett T., et al // N Engl J Med. - 1996. - Vol.335. - P.1041-48
15. Pieters R. // Leuk Res. - 1992. - Vol.78. - P.488-92
16. Beck W. // Biochem Pharmacol. - 1987. - Vol.36. - P.2879-2887
17. Cole S., Bhardwaj G., Gerlach J. et al // Science. - 1992. - Vol.258. - P.1650-1654
18. Dalton W. // Sem Hematol. - 1997. - Vol.34. - P.3-8
19. Tufuri A., Sommaggio A., Burba L. Et al // Leuk Res. - 1995. - Vol.19. - P.356-62
20. Slovac M., Ho J., Bhardwaj G. Et al // Cancer Res. - 1993. - Vol.53. - P.3221-3225
21. Slovac M., Ho J., Bhardwaj G. Et al // Cancer Res. - 1995. - Vol.55. - P.4214-4219
22. List A. // Sem Hematol. - 1997. - Vol.34. - P.20-24
23. Yannun Y. // Blood. - 1997. - Vol.89. - P.1845-1853
24. Blagosklonny M. // Leukemia, 2000, 14, 1502-1518
25. Smith B.D., Bambach B., e.a. // Br. J. Hematol., 1998, 102, 1042-1049
26. Владимирская Е.Б., Масчан А.А., Румянцев А.Г. // Гематол и Трансфузиол. - 1997. - №5. - с.4-9
27. Baker S., Markowitz S. // Science. - 1990. - Vol.249. - P.912-915
28. Den Boer M.L., Pieters R., Kazemier K.e.a. // Blood. - 1998. - Vol.91. - P.2092-2098

29. Solary E., Droin N., e.a. // *Leukemia*, 2000, 14, 1833-1849
30. Chan T., Hermeking H., e.a. // *Nature*, 1999, 401, 616-620
31. Lowe S., Ruley X., Jacks T. // *Cell*.-1993.-Vol.74.-P.957-967
32. Kastan M., Zhan Q. // *Cell*.-1992.-Vol.71.-P.587-97
33. Lowe S. // *Science*.-1994.-Vol.266.-P.807-809
34. Lai J., Preudhomme C., Zandecki M. Et al // *Leukemia*.-1995.-Vol.9.-P.370-81
35. Marks D., Kurz B., Link M. Et al // *Blood*.-1996.-Vol.87.-H.1155-61
36. Mori N., Hidai H., Yokata J. // *Leuk Res*.-1995.-Vol.19.-869-75
37. Komarov P., Komarova E., Kondratov R., e.a. // *Science*, 1999, 285, 1733-1737
38. Fan S., Deiry W., Bae I. // *Cancer Res*.-1994.-Vol.54.-P.5824-30
39. Canman C., Gilmer T., Coutts S., et al // *Genes Dev*.-1995.-Vol.9.-P.600-611
40. Wang C., Mayo M., Baldwin A. // *Science*, 1996, 274, 784-787
41. Uhnel F., Zender L., e.a. // *J.Biol.Chem.*, 2000, 275, 6421-6427
42. Solary E., Droin N., e.a. // *Leukemia*, 2000, 14, 1833-1849
43. Lee K., Spielmann J., e.a. // *J.Immunol.*, 1996, 157, 1919-1925
44. Kondo T., Suda T., e.a. // *Nature Med.*, 1997, 3, 409-413
45. Bodmer J., Holler N., e.a. // *Nat.Cel.Biol.*, 2000, 1, 241-243
46. Nagata S. // *Phil Trans Soc Lond*.-1994.-Vol.345.-P.281-7
47. Debatin K.-M. // *Leukemia*.-1998.-Vol.12.-P.268.Abstr.
48. Bakhshi A., Jensen P., Goldman P. et al // *Cell*.-1985.-Vol.41.-P.889-906
49. Basu A., Halder S. // *Int.J.Oncol.*, 1998, 13, 659-664
50. Wang Z., Ruggero D., e.a. // *Nat.Genet.*, 1998, 20, 266-272
51. Quignon F., De Bels F., e.f. // *Nat.Genet.*, 1998, 20, 259-265
52. Grignani F., De Metteis S., e.a. // *Nature*, 1998, 391, 815-818
53. Sterndorf T., Puccetti E., e.a. // *Mol.Cel.Biol.*, 1999, 19, 5170-5178
54. Tsujimoto Y., Gorham J., Cossman J et al // *Science*.-1985.-Vol.229.-P.1390-3
55. Reed J. // *Sem Hematol*.-1998.-Vol.34.-P.9-19
56. Polyak K., Xia Y., Zweier J. et al // *Nature*.-1997.-Vol.389.-P.300-5
57. Liu G., Kleine L., Hebert R. // *Crit.Rev.Clin.Lab.Sci.*, 1999, 36, 511-573
58. Jaffrezou J.P., Bettaieb A., e.a. // *Leuk.Lymphoma*, 1998, 29, 453-463
59. Kaspers G., Veerman A., Pieters R., Et al // *Br J Cancer*.-1994.-Vol.70.-P.1047-52
60. Klumper E., Pieters R., Kaspers G. et al // *Leukemia*.-1995.-Vol.9.-P.1864-69
61. Pieters R., den Boer M., Kaspers G. et al. // *Leukemia*.-1998.-Vol.12.-P.262.Abstr
62. Norgaard J. // *Leukemia*.-1998.-Vol.12.-P.262.Abstr

Новые пути противоопухолевой терапии



Цель противоопухолевой терапии — индуцировать, по возможности, избирательно гибель опухолевых клеток. Существует 3 вида клеточной смерти: некроз, апоптоз и «медленная клеточная смерть» ^[1].

Клеточная смерть путем некроза происходит в тканях при действии на клетки больших доз токсических веществ. Это наблюдается при высокодозной противоопухолевой химиотерапии и лежит в основе ее высокой токсичности.

Апоптоз представляет собою клеточную смерть без воспалительного повреждения тканей в многоклеточном организме. Индукция этого, щадящего для организма вида клеточной смерти, и является преимущественной целью противоопухолевой химиотерапии. Основным биохимическим признаком апоптоза, как подробно рассмотрено в очерке 1, служит участие в этом процессе активированных каспаз. Однако было установлено, что ингибция каспаз не останавливает, а только отодвигает смерть клетки, по своей морфологии (интрануклеосомальная фрагментация ДНК) напоминающей апоптоз. Этот вид клеточной смерти получил название «медленной клеточной смерти» ^[2].

Онкогены Ras, Raf и митоген-активированные киназы ингибируют апоптоз путем воздействия на цитохром-С/каспаза-9 путь, но при этом могут арестовывать клетки с последующим развитием «медленной клеточной смерти» за счет отсроченной фрагментации ДНК. Механизмом действия в этих случаях является ингибция сигнальных молекул (циклокинов), в норме передающих пролиферативные сигналы. Такой вид смерти обычно связан со «старением», механизмом которого является укорочение теломерных участков хромосом, и нередко вызывается химиотерапевтическими препаратами, особенно в опухолевых клетках, резистентных к апоптозу ^[3].

Основную цель противораковой терапии можно сформулировать как *уничтожение опухолевых клеток любым путем, независимо от вида индуцированной клеточной смерти. Средством выбора следует считать апоптоз или «медленную клеточную смерть» — наименее травматичные для целостного организма виды клеточной смерти*

Наиболее распространенный и хорошо отработанный способ индукции клеточной смерти опухолевых клеток — химиотерапия. Как было подробно рассмотрено в предыдущих очерках, программная противоопухолевая химиотерапия при своих несомненных достижениях имеет весьма существенные ограничения — отсутствие избирательного воздействия на опухолевые клетки и связанную с этим токсичность, а также частое развитие резистентности к используемым препаратам. В настоящем очерке мы остановимся на поиске альтернативных путей лечения, позволяющих обойти эти ограничения. Речь пойдет о направлениях терапии, связанных с воздействием на другие системы организма больного — сосудистую и иммунную системы, и с использованием некоторых отличительных биологических характеристик опухолевых клеток — особенностей кинетики клеточного цикла, состояния теломеров и теломеразы.

4.1. Опухолевый неангиогенез

Впервые роль неангиогенеза в формировании опухолевого роста и возможных направлениях терапии была определена около 30 лет назад в работах J.Folkman^[4,5]. Основные положения его гипотезы не утратили своего значения и в наши дни и могут быть сформулированы следующим образом:

- 1) Большинство первичных солидных опухолей до достижения размера 1-2 мм в диаметре получают кислород и питательные вещества, необходимые для роста, из окружающих тканей путем пассивной диффузии;
- 2) Для дальнейшего роста опухоли необходим неангиогенез, выражающийся в развитии новой капиллярной сети, инфильтрирующей опухоль;
- 3) Предполагалось, что запуск неангиогенеза вызывается специфическим ростовым фактором, который продуцируют и высвобождают клетки опухоли;
- 4) Блокирование опухолевого роста возможно путем подавления образования и активности ростовых факторов ангиогенеза или непосредственным воздействием на вновь образованные, незрелые кровеносные сосуды;
- 5) Такой способ воздействия на опухоль не вызывает ее эррадикации, а всего лишь ограничивает ее рост и экспансию, переводя заболевание в вяло текущий хронический процесс.

В последние 10-15 лет все постулаты этой концепции получили свое экспериментальное и клиническое подтверждение и развитие.

4.1.1. Стимуляторы неоангиогенеза

Было выделено 3 вида стимуляторов неоангиогенеза:

- основной фибробластный ростовой фактор (bFGF);
- фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF);
- ангиопоэтины;
- неспецифические, такие, как матрикс металлопротеиназа (MMP)

Первым был открыт *bFGF* [6]. Он был выделен из клеток хондросаркомы, способность стимулировать ангиогенез была доказана на различных моделях [7].

Источником *bFGF* могут быть многие клетки, в том числе и вновь образованные клетки эндотелия, аутокринно продуцирующие его. Стимуляцию пролиферации в клетках эндотелия *bFGF* осуществляет в кооперации с другими ангиостимулирующими факторами, пользуясь специфическими трансмембранными и внутрицитоплазматическими рецепторами [8] и способствуя в то же время выбросу других молекул (коллагеназы, интегринов, рецепторов), необходимых для новообразования сосудистой сети [9].

Клинические данные также подтверждают роль *bFGF* в опухолевом неоангиогенезе. Так, повышение уровня этого фактора в спинномозговой жидкости и моче коррелирует с масштабом развития сосудистой сети в опухоли и со степенью агрессивности процесса при многих солидных опухолях, лейкозах, лимфомах у детей и у взрослых и может служить прогностическим фактором агрессивности опухолевого процесса [10, 11, 12].

VEGF был открыт и подробно охарактеризован с молекулярно-биологических позиций уже во второй половине 90-х годов [13, 14]. Этот фактор, существующий в нескольких изоформах, активно выделяется многими опухолевыми клетками и специфически воздействует на эндотелиальные клетки, оказывая выраженные пропролиферативные и антиапоптотические эффекты. Эндотелиальные клетки вновь образованных сосудов экспрессируют тирозин-киназные рецепторы к VEGF и активно соединяются с ним. Не исключено и участие фибробластов стромального микроокружения в выработке VEGF в ответ на опухолевый рост [15].

Ангиопоэтины и их тирозин-киназные рецепторы были открыты совсем недавно [16]. Ангиопоэтин существует в двух формах: ангиопоэтин-1 (ang-1) и ангиопоэтин-2 (ang-2). Оба эти фактора пользуются одним и тем же рецептором — tie-2, лиганд для второго рецептора — tie-1- остается неизвестным. Из двух ангиопоэтинов только ang-1 является облигатным стимулятором ангиопоэза, ang-2 вызывает, напротив, регрессию сосудов в тех случаях, когда действует вне кооперации с другим стимулятором — VEGF, и только при кооперации с последним — запускает ангиогенез [17]. В эксперименте на мышцах с выключенными генами было выявлено большое значение этих ангиопоэтинов и их рецепторов для развития сосудистой сети в эмбриогенезе.

MMP человека представляют собою «семью» протеолитических ферментов, состоящую из 15 энзимов, основное назначение которых — расщепление структурных

белков экстрацеллюлярного матрикса (коллагена, фибронектина, ламинина, протеогликанов и др.). Физиологическая роль их связана с ремоделированием стромы в процессе ее роста и репарации ^[18]. Источниками образования ММР являются многие клетки, включая фибробласты, макрофаги, гладкомышечные клетки сосудистой стенки, нейтрофилы, их продукция увеличивается под влиянием цитокинов ^[19]. Клетки некоторых опухолей сами образуют ММР и, независимо от этого, любая опухоль является мощными индукторами образования ММР в клетках стромы. Способствуя инвазии опухолевого роста и метастазированию, ММР в то же время являются мощными стимуляторами неоангиогенеза. Эндогенные и синтетические ингибиторы ММР, открытые в последние годы, используются в качестве потенциальных противоопухолевых агентов, основное назначение которых - подавление неоангиогенеза ^[20].

4.1.2. Ингибиторы неоангиогенеза

Вслед за ангиопоэтинами была открыта широкая сеть эндогенных ингибиторов ангиопоэза ^[21]. Основные ингибиторы представлены в табл.4.1 ^[22].

Табл.4.1. Эндогенные ингибиторы ангиопоэза

Название	Описание
Тромбосподин-1	180 kDa, большой протеин экстрацеллюлярного матрикса
Ангиостатин	38 kDa фрагмент плазминогена
Эндостатин	20 kDa цинк-связывающий фрагмент коллагена XVIII типа
Вазостатин	N- терминальный фрагмент карлетикулина
Ингибитор фактора роста эндотелия (VEGI)	Белок, сод.174 аминокислоты, на 20-30% гомологичен TNF-суперсемье
Фрагмент фактора пластинок-4 (PP4)	N-терминальный фрагмент PP4
Дериват пролактина	16 kDa фрагмент гормона
Рестин	NC 10 домэн коллагена XV человека
Пролиферин-подобный протеин (PRP)	Протеин, подобный проангиогенной пролифериновой молекуле
Продукт расщепления SPARC	Фрагменты секретируемого протеина, кислый и богатый цистеином

Продукт расщепления остеопонтина	Тромбин-образующий фрагмент, содержащий RGD-последовательности
Интерферон α/β	Противовирусный протеин
TIMP-1, TIMP-2	Ингибиторы ММР, тормозят пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток
Ангиопоэтин-2	Антагонист ангиопоэтин-1, соединяющийся с рецептором tie-2
Фрагмент анти-на-3 тромбин-III	Фрагмент, не содержащий C-терминальную петлю антитромбина-III

Подобно тому как антионкогены сдерживают рост опухолевого клона, ингибиторы неоангиогенеза ограничивают инфильтрацию опухоли сосудами. Большинство эндогенных ингибиторов ангиогенеза, как видно из данных, представленных в табл. 4.1, являются фрагментами регуляторных белков, входят в состав экстрацеллюлярного матрикса, системы свертывания крови, и, по-видимому, неразрывно связаны с системами регулируемыми клеточный гомеостаз тканей. Можно предположить, что пусковым механизмом опухолевого ангиогенеза является сдвиг в соотношении стимуляторов к ингибиторам образования сосудов. При низком значении этого соотношения неоангиогенез блокируется или малоинтенсивен, напротив, при высоких значениях соотношения происходит активный запуск неоангиогенеза ^[23].

4.1.3. Взаимосвязь ангио- и туморогенеза

Получены многочисленные данные о существовании сложных взаимоотношений между механизмами, определяющими рост опухоли и контролирующими неоангиогенез.

Весьма примечательным является наблюдение Bouck с соавт., о том, что потеря контролирующей роли дикого типа гена P53 сопровождается и снижением экспрессии тромбоспоидина — ингибитора ангиогенеза ^[24]. Это как бы устанавливает связь между генетическими основами развития опухоли и опухолевого ангиогенеза. Подтверждается это предположение также и данными о том, что активация RAS- онкогена и онкогенов семьи erbB (стимуляторов опухолевого роста) сопровождается усилением продукции стимулятора ангиопоэза — VEGF ^[25]. В то же время продукция этого стимулятора блокируется повышением активности генов опухолевой супрессии — p16 и VHL ^[26].

Эндотелиальные клетки, в свою очередь, являются источником целого ряда цитокинов (SCF, Flt3-ligand, GM-CSF, IL-6), экспрессия которых усиливается под действием VEGF ^[27]. Эти цитокины стимулируют рост не только стволовых клеток, но и многих исходящих из них опухолей.

Таким образом, опухоль и сосудистая сеть составляют как бы «двуединую систему», в которой опухолевые клетки стимулируют развитие неоангиогене-

за, а новая капиллярная сеть, в свою очередь, питает опухоль и экспрессирует факторы, способствующие дальнейшему опухолевому росту. Разрыв этой петли обратной связи — новое направление противоопухолевой терапии.

4.1.4. Роль неоангиогенеза в развитии лейкозов и лимфом

Долгое время считалось, что неоангиогенез имеет значение только в развитии солидных опухолей. Однако в конце 90-х годов получены неопровержимые доказательства того, что лейкозы и лимфомы также зависимы от ангиогенеза [12, 28, 29, 30]. Данные, подтверждающие это утверждение суммированы в табл.2.

Табл.4.2. Ангиогенез в костном мозге при лейкозах

Случаи	Число случаев	Плотность микрососудов*	Авторы
ОЛЛ дети	40	42	[12]
Контроль	39	6	[12]
Контроль	14	6 ± 2	[28]
Инфекция	5	10 ± 8	[28]
МДС (все)	82	21 ± 9^a	[28]
РА	14	21 ± 7	[28]
РСА	13	19 ± 8	[28]
РАУБ	35	19 ± 8	[28]
РАУБт	11	28 ± 12	[28]
ХММЛ	4	28 ± 5	[28]
Фиброз	4	29 ± 8	[28]
ОМЛ	15	$30 \pm 12^{a,b}$	[28]
ХМЛ	14	$40 \pm 14^{a,b,c}$	[28]

*-плотность микрососудистых скоплений — по мечению антителами к фактору Вил-лебранда в работе [12] и МКАТ к CD-34+ в работе [28] — среднее число скоплений на одно поле зрения микроскопа площадью $0,77 \text{ мм}^2$ (при просмотре 200-250 полей зрения).

^a — $P < 0,05$ достоверность различия с контролем

^{a,b} — $P < 0,05$ достоверность различия с МДС

^{a,b,c} — $P < 0,05$ достоверность различия с ОМЛ

Как видно из представленных в табл.2 данных, в костном мозге больных лейкозами и МДС обнаружена высокая плотность вновь образованных сосудов. При этом, как отмечают исследователи, лейкемические клетки окружали капилляры плотным кольцом, составлявшим 5-6 слоев, в отличие от одного в контрольном костном

мозге. Петли вновь образованных сосудов оставались в костном мозге больных ОЛЛ после наступления ремиссии. У больных лейкозами выявлялось и значительное повышение в моче и крови b-FGF и VEGF — стимуляторов неоангиогенеза. Таким образом, онкогематологические заболевания также могут быть мишенью для антиангиогенной терапии.

4.1.5. Основные принципы и перспективы терапии, направленной на подавление опухолевого неоантогенеза

Терапия, направленная на подавление ангиогенеза, может быть прямого и непрямого действия.

Первое направление включает в себя агенты, мишенью действия которых являются сосуды опухоли. К ним относятся:

- ингибиторы ангиогенеза, такие как эндостатин, ангиостатин и др.
- конъюгаты VEGF-токсин^[31];
- антагонисты VEGF-рецептора^[32, 33].
- антитела к VEGF-рецептору^[34, 35];
- нейтрализующие антитела и молекулы-антагонисты к рецепторам интегринов и молекул адгезии, специфически экспрессируемых на вновь образованных эндотелиальных клетках^[36].

Достоинством этого вида терапии является то, что ее мишенью являются здоровые, генетически стабильные клетки, а, следовательно, ее длительное применение не сопровождается развитием резистентности.

Благоприятным фактором следует считать и то, что избирательно чувствительны к ней вновь образованные эндотелиальные клетки. Это дает возможность избежать токсических поражений сосудов и не снижает доступа лекарств в опухоль.

«Непрямое» подавление ангиогенеза связано с терапией, направленной на снижение образования или нейтрализацию стимуляторов неоангиогенеза, в первую очередь фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и матрикс-металлопротеиназ (ММР). Это может достигаться несколькими способами:

- нейтрализующими VEGF антителами^[37];
- ингибиторы и антагонисты ММР^[38];
- цитотоксическими средствами.

Противососудистое действие некоторых противоопухолевых препаратов (таксаны, ингибиторы топоизомеразы, пуриновые антиметаболиты), включая цитокины и ионизирующую радиацию показано было во многих доклинических и экспериментальных исследованиях. Первым «сосудисто-направленный» эффект химиотерапии был описан Denekamp в 1993 г.^[39] В основе его лежит торможение синтеза VEGF и

других стимуляторов неоангиогенеза в опухолевых клетках. Преимуществом такого способа влияния на сосуды опухоли является избирательное воздействие на новообразование сосудов, недостатком — развитие лекарственной резистентности.

Весьма перспективными в этом отношении является новый класс соединений, прокладывающий себе путь в клиническую практику, - ингибиторы молекул сигнальной трансдукции. К ним относятся, например, ингибиторы RAS - фарнезилтрансферазы и моноклональные антитела, нейтрализующие рецептор EGF (эпидермальный ростовый фактор) - Herceptin^[40]. Способность этих препаратов блокировать ангиогенез связана с тем, что активация онкогенов в опухолевых клетках способствует не только повышению их репродуктивной активности, но и одновременно стимулирует индукцию проангиогенных факторов, таких как VEGF. Препараты, блокирующие онкопротенины, вызывают также и снижение экспрессии стимуляторов ангиогенеза. Наилучший эффект в преклинических испытаниях получен при сочетании этих препаратов с обычными цитотоксическими агентами, такими как циклофосфан, цисплатина, таксол^[41].

Таким образом, включение препаратов, подавляющих васкуляризацию опухоли, в программную противоопухолевую терапию представляется весьма перспективным. Проблемы, возникающие при этом, можно разделить на 2 группы:

1. Антиангиогенная терапия не вызывает быстрого сокращения массы опухоли, а лишь препятствует ее дальнейшей экспансии. Исходя из этого, в индукционной терапии ее рекомендуется сочетать с программной противоопухолевой химиотерапией.

2. Антиангиогенная терапия в арсенале противоопухолевого лечения должна быть длительной, по существу, хронической. Это делает актуальным проблему токсических осложнений. К таким осложнениям относятся спастическая дисплегия и нарушения роста у младенцев, дистрофические язвы, кардиоваскулярные осложнения у лиц пожилого возраста. Во избежание этих осложнений следует особенное внимание уделить разработке препаратов, избирательно действующих только на новообразование сосудов в опухоли.

Эта область терапии онкологических заболеваний активно развивается, начинает проходить стадию интенсивных клинических испытаний.

4.2. Противоопухолевая вакцинация

Противоопухолевая вакцинация является новым, быстро развивающимся методом иммунотерапии, цель которого - коррекция и усиление противоопухолевого иммунного надзора.

Представления о формировании противоопухолевого иммунитета существенно расширились в последнее десятилетие. Было выделено значительное число специфических антигенов, ассоциированных с различными типами опухолей, включая меланому, рак шейки матки, толстого кишечника, легких, миелоидные лейкозы и др.^[42;43; 44].

Цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) — эффекторы противоопухолевого иммунитета - узнают опухолевый антиген только сцепленный с молекулами класса I

МСН на поверхности клеток-мишеней или антиген-презентирующих клеток [45; 46]. Антиген-презентирующие, дендритные, клетки представляют собою моноциты/макрофаги, свободные и фиксированные в тканях, костномозгового происхождения [47]. Дендритные клетки отличаются высокой способностью усваивать растворенные антигены и презентировать их на своей поверхности в соединении с молекулами класса I и II МСН- комплекса. В то же время дендритные клетки экспрессируют цитокины и коstimуляторные молекулы, ответственные за наработку Т лимфоцитов - хелперов и Т лимфоцитов — супрессоров (цитотоксиков) [48].

Противоопухолевая иммунная реакция формируется в процессе клеточной кооперации 3-х элементов иммунной системы: дендритные клетки, Т-лимфоциты — хелперы (CD-4+) и цитотоксические Т-лимфоциты (CD-8+) . Схематически это представлено на рис.4.1.

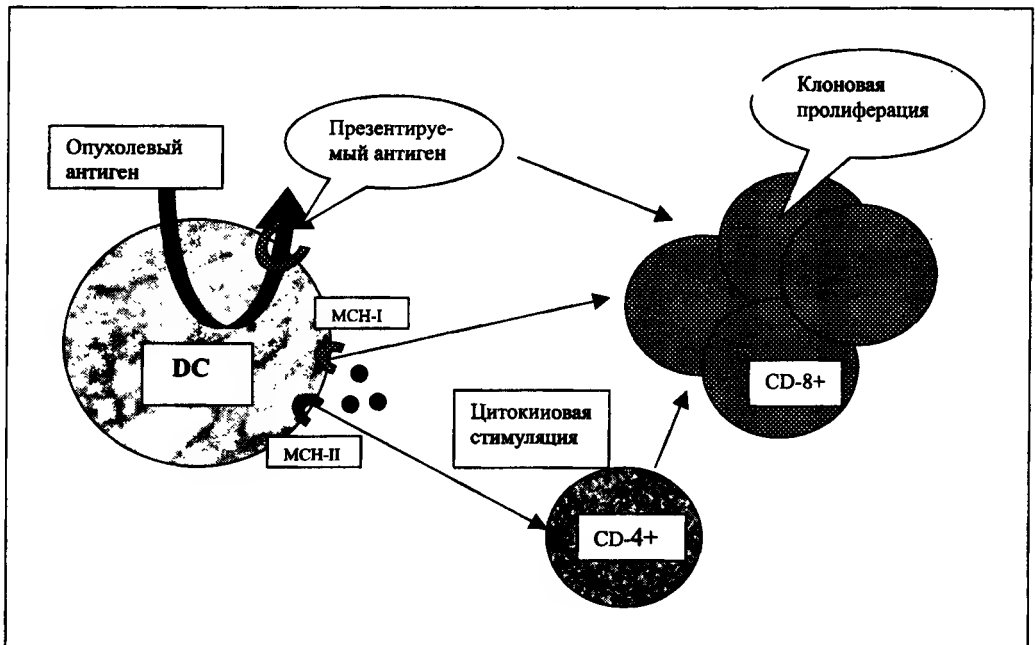


Рис.4.1. - Схема образования противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL)

DC – дендритные клетки

CD-4+ - Т-лимфоциты - хелперы

CD-8+ - Т-лимфоциты – цитотоксики (супрессоры)

МСН-I – молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса

МСН-II- молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса

- молекулы, коstimулирующие активность дендритных клеток.

Как представлено на схеме, формирование клона специфических цитотоксических CD-8+ Т-лимфоцитов, уничтожающих опухоль, происходит при одновременном воздействии 3-х групп факторов:

- опухолевого антигена, представленного CD-8+ Т-лимфоцитам с помощью молекул класса I МНС на поверхности дендритных клеток;
- костимуляторных молекул и цитокинов, экспрессируемых дендритными клетками;
- CD-4+ Т-лимфоцитов, активируемых опухолевым антигеном, сцепленным с молекулами класса II МНС на поверхности дендритных клеток, и запускающих клонную пролиферацию специфических цитотоксических Т-лимфоцитов.

Таким образом, дендритные клетки, а не сами опухолевые клетки ответственны за индукцию противоопухолевого иммунитета.

По современным представлениям, снижение противоопухолевого иммунного надзора при развитии опухоли связано с нарушением функции дендритных клеток [49]. Эти дефекты обусловлены прежде всего снижением экспрессии молекул класса I и II комплекса МНС (презентация антигена) и молекул В7-1, костимулирующих активность Т-лимфоцитов [50]. Эти данные позволяют предположить, что дефекты противоопухолевого иммунитета могут быть преодолены обеспечением успешной презентации антигена.

Механизмы нарушения функции дендритных клеток при развитии опухоли до конца неясны. Существует предположение, что это связано с факторами, выделяемыми опухолевыми клетками [51]. Действительно, в эксперименте получены данные, свидетельствующие о том, что развитие опухоли у мыши приводит к нарушению созревания дендритных клеток, снижению экспрессии молекул II класса МНС на их поверхности. При этом иммунизация мыши дендритными клетками, образованными из костномозговых предшественников такой мыши *ex vivo*, снижает рост опухоли, а введение зрелых дендритных клеток из селезенки не оказывает влияния на опухолевый рост. Было также показано, что супернатант опухолевых клеток снижает способность дендритных клеток контролировать цитотоксическую функцию аллогенных Т-клеток мыши, только в том случае, когда с ним инкубируют созревающие дендритные клетки, полученные из костного мозга, а не зрелые клетки из селезенки мыши, несущей опухоль [50; 52].

Эти данные были подтверждены при изучении функции дендритных клеток у больных с диссеминированным раком грудной железы. Было показано, что зрелые дендритные клетки этих больных не способны стимулировать цитотоксический тест с контрольными Т-лимфоцитами, в то время, как способность Т-лимфоцитов этих больных подвергаться аллогенной стимуляции не была нарушена. При этом дендритные клетки, образованные под действием GM-CSF и IL-4 из предшественников, полученных из периферической крови этих же больных, демонстрировали нормальный уровень функциональной активности [53].

Добавление супернатанта опухолевых клеток, полученных при культивировании клеточных линий рака грудной железы человека, снижал функцию дендритных клеток

при их образовании из CD-34+ гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови человека под целенаправленным действием цитокинов. При этом впервые был расшифрован механизм этого подавления. Было показано, что действующим началом в опухолевом супернатанте является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), который, связываясь с Flt-1 рецептором на поверхности гемопоэтических предшественников, тормозит активность транскрипционного фактора NF- κ B, что и приводит к нарушению созревания дендритных клеток [54, 55].

Таким образом, данные, полученные в эксперименте и у онкологических больных, демонстрируют дефектность дендритных клеток, являющихся ключевым звеном в формировании противоопухолевого иммунитета.

На различных моделях четко показано, что причиной нарушения функции дендритных клеток являются факторы, выделяемые опухолевыми клетками и действующие в процессе образования дендритных клеток из кроветворных предшественников. При этом сами кроветворные предшественники остаются интактными и способны при повторной стимуляции генерировать нормальные дендритные клетки.

Исходя из этого, современная противоопухолевая вакцинация включает в себя обязательное восстановление функции дендритных клеток, что достигается либо введением их вместе с опухолевым антигеном, либо стимуляцией их образования из кроветворных предшественников в организме больного. Работы по разработке методов противоопухолевой вакцинации нарастают в последние годы с лавинообразной быстротой. Схематично их можно разделить на следующие группы:

А. Введение активированных дендритных клеток:

- Введение аутологичных дендритных клеток, предварительно инкубированных с опухолевым антигеном, в организм больного вместе с цитокинами, стимулирующими активность Т-лимфоцитов [56];
- Введение аутологичных дендритных клеток вместе с опухолевым антигеном или опухолевыми клетками больного [46];
- Использование аутологичных дендритных клеток, в которые генно-инженерным путем введен специфический опухолевый антиген и/или факторы стимуляции Т-лимфоцитов [57];

В. Стимуляция образования активных дендритных клеток в организме:

- Введение облученных опухолевых клеток, в которые предварительно генно-инженерным путем введены гены цитокинов (например, G-CSF), стимулирующие паракринное образование дендритных клеток [58];
- Введение облученных опухолевых клеток вместе с аллогенной клеточной линией, экспрессирующей в результате генной трансдукции большое количество человеческого G-CSF, стимулируют образование дендритных клеток в организме больного [59];
- Введение опухолевого антигена, рекомбинантного или продукта деградации соответствующего онкопротеина, вместе с цитокинами, стимулирующими созревание дендритных клеток и Т-лимфоцитов (например, G-CSF и IL-2) [60].

Снижение иммунной реактивности, связанной с функцией цитотоксических Т-лимфоцитов, наблюдается при развитии большинства опухолей, но быстро восстанавливается при достижении ремиссии хирургическим, радиологическим или химиотерапевтическим способами. Именно этот период и является наиболее удобным для применения противоопухолевой вакцинации, которая может рассматриваться как наиболее эффективный путь борьбы с «минимальной остаточной болезнью».

Интересные данные получены при применении вакцинации в лечении острого миелобластного лейкоза. Показано, что антрациклиновые антибиотики, в отличие от других антилейкемических препаратов, не вызывают снижения противоопухолевого иммунитета [61]. Получен хороший клинический эффект в пилотном исследовании сочетания антрациклиновой химиотерапии с вакцинотерапией GM-CSF-трансдуцированными аутологичными опухолевыми клетками [62]. Использование вакцинотерапии в посттрансплантационный период у больных с ОМЛ и ХМЛ повышает интенсивность реакции «трансплантат против опухоли», не усиливая реакции «трансплантат против хозяина» [63].

Противоопухолевая вакцинация проходит период нового рождения с учетом последних достижений молекулярной генетики и иммунологии, из доклинических и экспериментальных исследований она уверенно переходит в клинику.

4.3. Кинетическая тактика противоопухолевой терапии

Представления об особенностях кинетического состава опухолевых клонов и преимущественной активности противоопухолевых препаратов в тех или иных фазах клеточного цикла неоднократно использовались в попытках оптимизации лечения.

Особые надежды возлагались на, так называемую, «синхронизирующую терапию», в основе которой лежал описанный на рубеже 60-х и 70-х годов блокирующий эффект цитозин-арабинозида и метотрексата на лейкемические клетки в S-фазе митотического цикла [64,65,66,67]. Под синхронизацией понималось накопление в «митотической ловушке» большого числа клеток, которые после снятия медикаментозного блока могут плотной когортой проходить через другие фазы митотического цикла, представляя собой удобную мишень для препаратов, активно уничтожающих клетки в этих фазах. «Синхронизирующая» терапия себя не оправдала, не было получено подтверждения ее клинической эффективности в долгосрочном прогнозе. Как выяснилось позднее, блокирующий эффект цитозина и метотрексата очень индивидуален, а механизм действия большинства химиопрепаратов менее специфичен по отношению к фазам митотического цикла, чем представлялось ранее [68,69,70]. В качестве примера приводим сегодняшние представления о фазовоспецифичности действия препаратов, применяющихся в терапии острого миелобластного лейкоза, представленные на рис.4.3.1.

Фаза G_0 , в которой пребывает значительная часть опухолевых клеток, издавна считалась своеобразным укрытием от действия противоопухолевых препаратов [71].

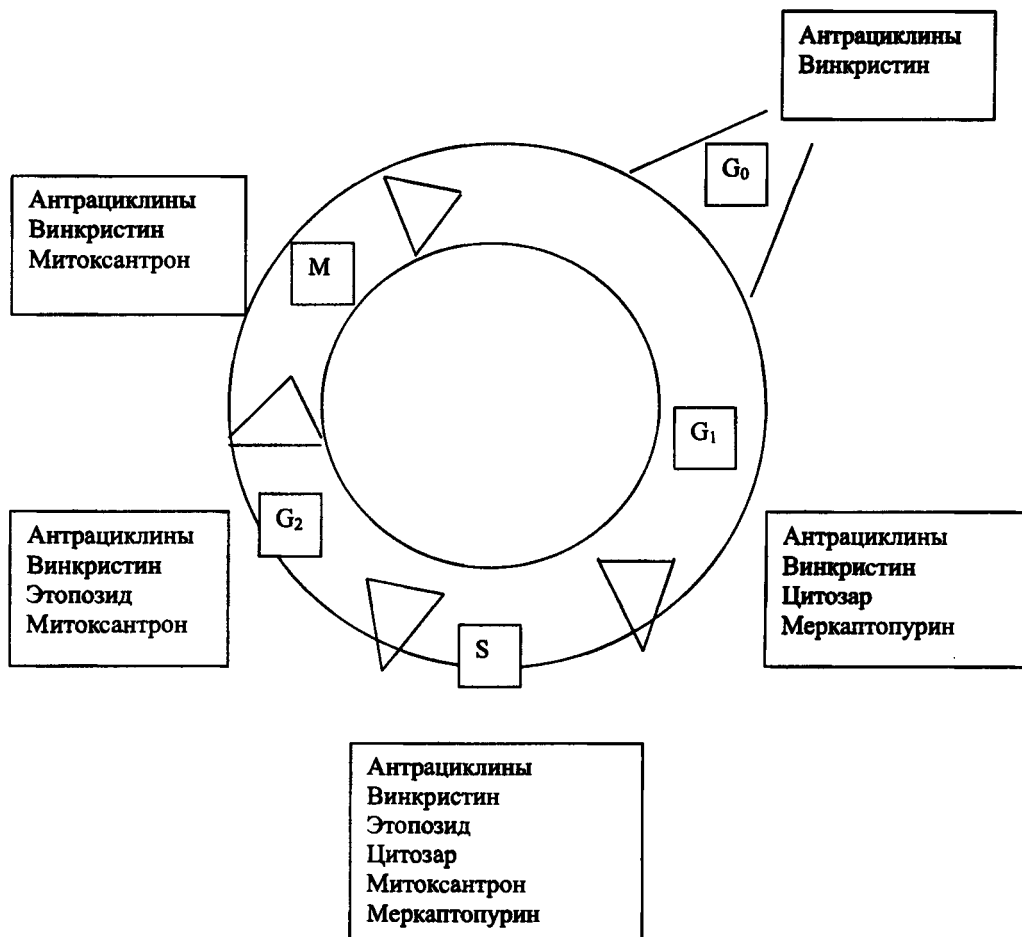


Рис.4.3.1. Фазовоспецифическая активность антилейкемических препаратов.

G₀ –фаза покоя

G₁ – фаза постмитотического отдыха

S – фаза синтеза ДНК

G₂ – фаза премитотического покоя

^{76]}. Исходя из этого, была разработана тактика «мобилизирующей» терапии при остром миелобластном лейкозе ^[77]. В качестве такого «мобилизатора» предлагалось использовать GM-CSF, возвращающий клетки в митотический цикл. Однако и эта тактика терапии не подтвердила свою клиническую эффективность и не получила распространения ^[78,79,80]. Теоретически такая модификация терапии не может оптимизировать лечение, т.к. GM-CSF, будучи мощным антиапоптотическим фактором, снижает способность лейкемических бластов к апоптозу, а тем самым уменьшает их чувствительность к действию химиотерапии.

Полученные в последние годы данные о механизмах регуляции митотического цикла и нарушениях в прохождении его опухолевыми клетками открывают новые перспективы в разработке кинетической тактики противоопухолевой терапии.

4.3.1. Регуляция митотического цикла в нормальных и опухолевых клетках

В регуляции митотического цикла ведущую роль играют следующие сигнальные молекулы:

- Циклин-зависимые киназы (cdk) и циклины — белки, образующие с ними активные комплексы;
- Белковый продукт гена ретинобластомы (pRb);
- Ингибиторы циклин-зависимых киназ (CKIs).

Клеточным делением руководит согласованное действие сети гомологичных *серин-треониновых киназ*, получивших название *циклин-зависимых киназ* (cdk). Описано 9 cdk (cdk1- cdk9) и 15 различных типов циклинов (от А до Т) [81,82,83]. Для каждой фазы митотического цикла характерна активность определенного типа циклинов и циклинзависимых киназ, эти данные представлены на рис.4.3.2.

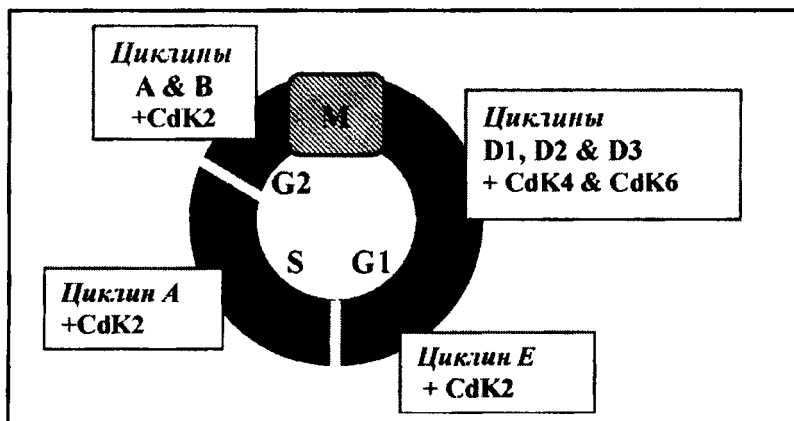


Рис.4.3.2. Активность циклинов в различных фазах митотического цикла

Взаимодействие сигнальных молекул, контролирующих прохождение клетками митотического цикла, схематично представлено на рис.4.3.3.

Решающая роль в переходе клеток из фазы G1 в фазу S принадлежит циклину D и циклину E и связанных с ними cdk's. Первыми в G1 фазе активируются циклины D1,2,3 и специфически связанные с ними Cdk 4/Cdk 6 [84]. Активация этих циклинов требует постоянного действия ростовых факторов, что позволяет считать циклины D сенсорами внешних сигналов, регулирующих клеточный цикл [85]. Ингибитора-

ми активности этих циклинов в некоторых клеточных системах (например, в миелоидных клетках) является TGF β [86]. Циклин Е аккумулируется в фазе G1 позже, в специфическом комплексе с Cdk2. После вхождения клетки в S фазу содержание циклина Е и киназная активность циклин Е/Cdk2 комплексов постепенно снижается.

Узловым моментом в жизненном цикле клетки является принятие решения о переходе из фазы G1 в фазу S и начале синтеза ДНК. Механизм такого решения связан с процессами фосфорилирования-дефосфорилирования *pRb* [85,86].

Фосфорилирование *pRb* происходит в G1 фазе под действием циклина D/Cdk 4(6). В результате этого происходит высвобождение связанного с нефосфорилированной формой *pRb* транскрипционного фактора E2F, способного активировать комплекс циклин Е/Cdk2, обеспечивая переход из фазы G1 в фазу S [87]. Многие гены, ответственные за пролиферацию, имеют в своем промоторе сайт связывания с E2F [88].

Проапоптотическая функция *pRb* осуществляется его нефосфорилированной формой в комплексе с транскрипционным фактором E2F. При фосфорилировании и потере транскрипционного фактора *pRb* превращается из индуктора в супрессор апоптоза и в такой форме существует до фазы митоза, где в анафазе происходит быстрое дефосфорилирование и возвращение гену его проапоптотической функции [85]. Эти сложные взаимодействия схематически представлены на рис.4.3.3.

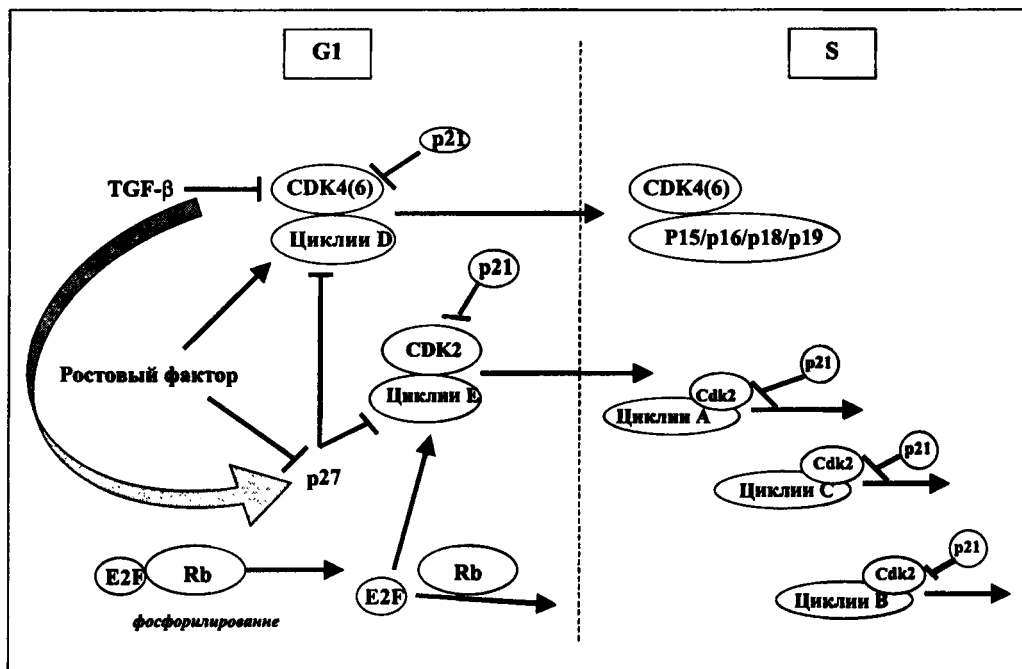


Рис.4.3.3. Схема регуляции митотического цикла

Метаболические нарушения, происходящие в опухолевой клетке, затрагивают и механизмы регуляции митотическим циклом, направлены на повышение пролиферативной активности. Основные из них представлены в табл.4.3.1.

Таблица 4.3.1. Белки-регуляторы митотического цикла в клетках опухолей^[85]

Белки	Картирование	Изменения в опухолевых клетках
Циклин D1	11q13	Оверэкспрессия, при раках головы и шеи, грудной железы, В-клеточных лимфомах
Циклин D2	12q13	Оверэкспрессия при раке толстого кишечника
Циклин E	19q12	Оверэкспрессия при ХМЛ, агрессивном течении рака грудной железы
Циклин A1	13(q12.3-q13)	Оверэкспрессия при ОМЛ
Циклин A2	4(q25-q31)	Оверэкспрессия при раке грудной железы
Циклин B1	5q13	Оверэкспрессия при раке грудной железы
Циклин C	6q21	Делеция при некоторых формах ОЛЛ
Cdk4	12q13	Амплификация при опухолях мозга, саркомах

Как видно из представленных в таблице данных, в клетках опухоли часто отмечается происходящее на генном уровне усиление активности циклинов, поддерживающих митотический цикл.

Ингибиторы циклин-зависимых киназ (CDKIs) — белки, контролирующие прохождение митотического цикла, и потому могут считаться потенциальными ингибиторами опухолевого роста. У млекопитающих CDKIs могут быть подразделены на 2 группы: семья Kip/Cip и семья INK4^[85].

К семье Kip/Cip относятся 3 гомологичных белка: p21, p27 и p57. Образование белка p21 индуцируется диким типом гена p53. Являясь ингибитором циклин-киназ, переводящих клетки из G1 в S-фазу, белок p21 способен арестовывать клетки в G1 фазе митотического цикла. Например, облучение индуцирует активность гена p53, следствием чего является усиление транскрипции p21; повышение уровня этого фактора тормозит активность E/Cdk2-киназы, вызывая арест облученных клеток в G1-фазе митотического цикла^[89]. Инактивация гена, транскриптом которого является p21, очень редко наблюдается при онкологических заболеваниях^[90]. Предполагается, что такое поражение должно быть фатальным для клеток.

p27-белок не зависит от p-53 гена, способствует выходу клеток из митотического цикла, его уровень регулируется внешними сигналами. Например, покоящиеся Т-лимфоциты начинают синтезировать циклины и циклин-зависимые киназы в ответ на стимуляцию Т-клеточного рецептора, однако, для вхождения в митотический цикл им необходим второй митогенный сигнал — IL-2, который снижает активность p27^[91]. Повреж-

дение этого гена при опухолях наблюдается также редко, отмечается лишь при Т-клеточных острых лейкозах и лимфомах, свидетельствует о высокой агрессивности опухолевого роста и плохом прогнозе [92].

Экспрессия p57 также независима от p53 гена, накопление его наблюдается у дифференцированных клеток, чем обеспечивается их выход из митотического цикла [93]. Существенной роли в опухолевой трансформации не играет.

Ингибиторы цитокин-зависимых киназ семьи INK4 (p14, p15, p16, p18, p19) формируют комплексы только с Cdk4 и Cdk6, ингибируя их активность. Гиперметилирование, т.е. инактивация этих генов, наблюдается в 80% Т-ОЛЛ и 15% преВ-ОЛЛ, при некоторых формах лимфом, а также в стадиях, предшествующих бластной трансформации миелопоэтической дисплазии [94,95].

Таким образом, создается впечатление, что нарушения в механизмах, контролирующих прохождение клетками митотического цикла, в особенности, инактивация ингибиторов цитокин-зависимых киназ, являются существенным этапом в формировании опухолевого роста.

4.3.2. Медикаментозная модуляция кинетики опухолевого роста

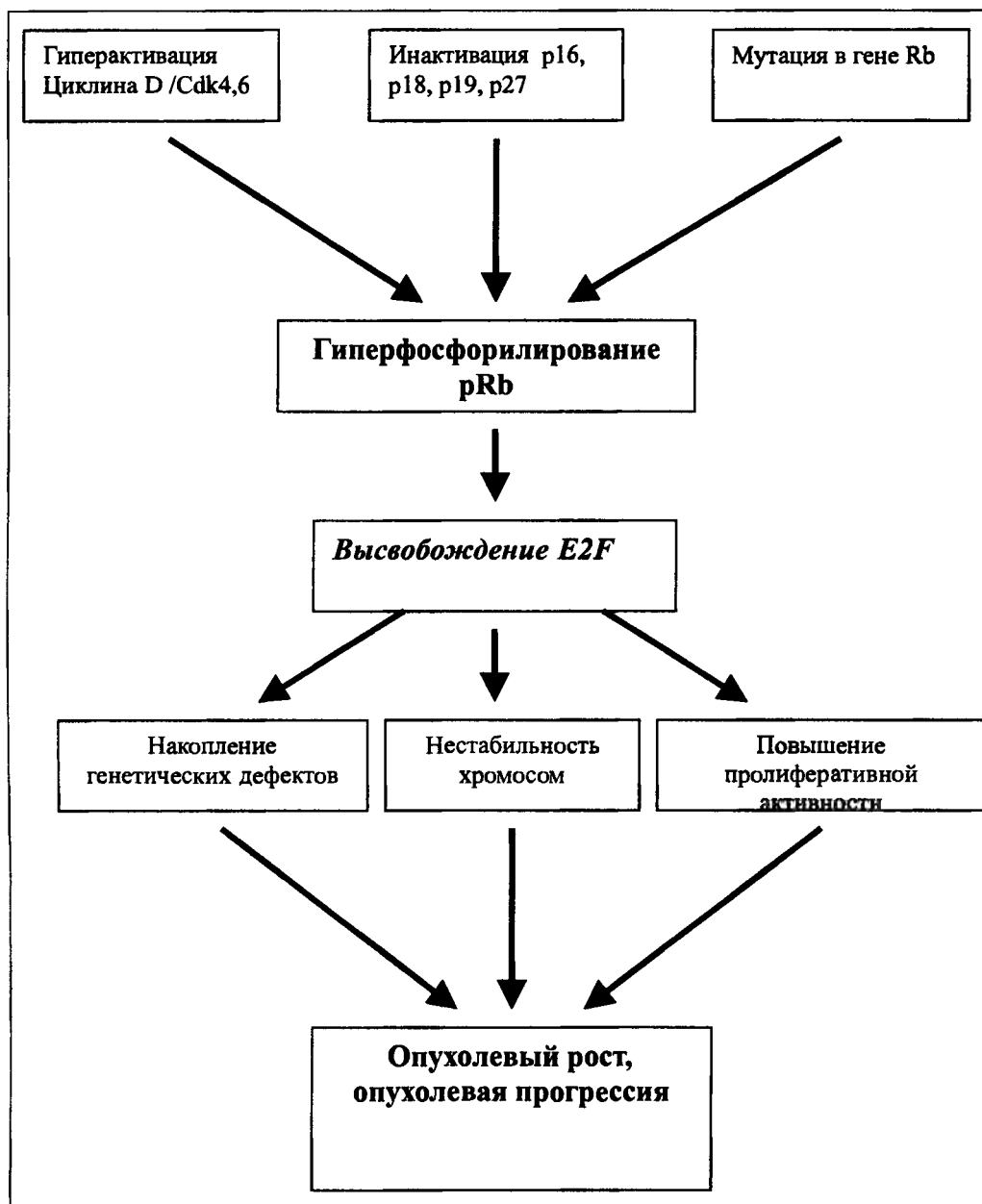
В последние годы стало очевидным, что нарушения в клеточном цикле, ведущие к бесконтрольным и нежелательным делениям, являются ключевыми событиями в развитии опухолевого роста. В то же время оказалось, что супрессорные гены p53 и Rb реализуют свой эффект в том числе и через воздействие на механизмы регуляции клеточного цикла. Все это сделало вновь актуальным поиск путей противоопухолевой терапии, ориентированных на кинетику опухолевых клеток.

Почти во всех опухолях человека обнаруживаются нарушения в путях трансформации pRb, являющегося стержнем в регуляции клеточного цикла. Как показано схематически на рис.4.3.4, это может быть либо следствием гиперактивации циклин-зависимых киназ, либо результатом снижения активности негативных факторов — ингибиторов Cdk, либо связано с мутациями в самом гене Rb [96,97]. Все это приводит к усилению пролиферативной активности, нестабильности генома и накоплению хромосомных нарушений, лежащих в основе опухолевого роста и развития опухолевой прогрессии.

Исходя из этого, представляется теоретически совершенно оправданным использовать модуляцию активности циклин-зависимых киназ в качестве новой стратегии противоопухолевой терапии.

Эта стратегия может быть разделена на 2 направления:

- Непосредственное подавление циклин-зависимых киназ;
- Модуляция активности циклин-зависимых киназ путем воздействия на пути их регуляции.

**Рис.4.3.4.** Роль pRb в развитии опухолевого роста

К первому направлению относится использование прямых ингибиторов Cdk, блокирующих сайты связывания с АТФ. Первым препаратом такого рода, тестируемым в клинических протоколах, был *флавопиридол* [98]. Доклинические исследования показали, что *флавопиридол* тормозит все виды Cdk's, циклин D1 и D3, что приводит к остановке клеток в фазах G1 или G2/M митотического цикла. В то же время препарат вызывает апоптоз (механизм которого не вполне ясен) даже в покоящихся клетках. В эксперименте на животных было также показано, что *флавопиридол* обладает, наряду с противоопухолевым эффектом, выраженным ангиостатическим действием [99]. Фаза I клинических испытаний этого препарата была проведена у больных с Неходжкинской лимфомой, раками почек, предстательной железы, толстой кишки, желудка и легких. Основными побочными эффектами были секреторная диаррея и воспалительный синдром с гипотензией. У большинства больных, включенных в эту фазу клинических испытаний, отмечалось уменьшение массы опухоли и стабилизация процесса. Вторая фаза клинических испытаний *флавопиридола* проводится у больных с ХЛЛ и лимфомой мантийной области [100].

К препаратам второй группы относится *UCN-01*- ингибитор кальциево-зависимых протеинкиназ [101]. Этот препарат оказывает выраженный антипролиферативный эффект на разнообразные опухолевые клетки, вызывая арест клеток в G1 фазе митотического цикла, связанный с гипофосфорилированием pRb и накоплением ингибиторов циклин-зависимых киназ - p21 и p27. Состояние p53 и pRb не влияет на реализацию эффекта препарата. Фаза I клинических испытаний была проведена у больных с меланомой, неходжкинской лимфомой и лейомиосаркомой. Во всех случаях отмечалась стабилизация процесса, среди побочных эффектов основными были головная боль, тошнота или рвота, симптоматическая гипергликемия и гипоксемия. В одном случае анапластической лимфомы, рефрактерной к большим дозам цитостатической терапии, отмечалась полная ремиссия в течение 3-х лет после прекращения *UCN-01*-терапии.

Таким образом, в соответствии с современными представлениями об особенностях клеточной кинетики, циклин-зависимые киназы являются ключевыми фигурами в регуляции митотического цикла опухолевых клеток. Их гиперактивация, ведущая к отмене нормальной регулирующей функции Rb-гена, наблюдается примерно в 90% всех опухолей (включая онкогематологические заболевания).

Медикаментозное подавление циклин-зависимых киназ приводит к остановке пролиферации, аресту и апоптозу клеток опухоли и может быть резервом для противоопухолевой терапии.

Клинические испытания первых препаратов, предложенных с этой целью (*флавопиридол* и *UCN-01*), подтвердили перспективность этого направления. Остается пока неясным, как эти препараты следует сочетать со стандартной химиотерапией для реализации оптимального эффекта, что является предметом многочисленных клинических исследований в наши дни.

4.4. Теломер и теломераза в канцерогенезе

Гипотеза о роли теломера/теломеразы в старении клеток и развитии опухолевого роста стала получать все большую экспериментальную и клиническую поддержку и может быть продуктивно использована как для понимания некоторых вопросов канцерогенеза, так и для разработки новых путей противоопухолевой терапии.

4.4.1. Роль теломера и теломеразы в регуляции опухолевого роста

Теломерами называют концевые участки хромосом, состоящие из сотен повторяющихся строго определенных нуклеотидных последовательностей (TTAGGG)_n [102;103;104]. Эти последовательности, напоминающие «шапочки», надетые на концы хромосом, выполняют важную функцию в сохранении стабильности хромосом, предохраняя их от слияний, транслокаций и других поломок в процессе митоза [105]. Из-за существования, так называемых, «проблем концевой репликации ДНК», выражающихся в невозможности полного восстановления длины теломера при каждом ресинтезе ДНК, в процессе деления соматических клеток происходит его последовательное укорочение [106;107]. Достигание теломером минимальной длины, способной защитить хромосомы от повреждения при митозе, является сигналом для выхода клеток из митотического цикла [108]. Исходя из этого, теломеры принято считать «биологическими часами клетки», их роль в процессах репликационного «старения» изучается [109].

Длина теломеров обычно определяется после расщепления клеточной ДНК мелкощепляющими рестриктазами путем измерения терминальных рестрикционных фрагментов (теломеры не расщепляются) мечеными теломерными олигонуклеотидами в реакции блот-гибридизации и выражается числом «килобаз» (kb) [110].

В табл. 4.4.1. приведены данные о средней длине теломеров кроветворных клеток различных иерархических уровней.

Табл.4.4.1. Длина теломеров различных кроветворных клеток (kb).

Источник клеток	Д л и н а т е л о м е р о в	
	Ядросодержащие клетки [111,112]	CD-34+ клетки [113]
Печень плода	2-16	10,4
Пуповинная кровь	8-10	10,4
Периферическая кровь молодых	10	7,4
Периферическая кровь престарелых	5	7,4
Костный мозг взрослых	-	7,6

Из представленных данных следует, что наиболее длинные теломеры были выявлены в клетках тканей плода и новорожденных. В мононуклеарных и CD-34+ клетках периферической крови и костного мозга взрослых длина теломеров оказалась значительно ниже. В последние годы было установлено, что укорочение теломеров в детском возрасте происходит значительно скорее, чем у взрослых. Так, в работе Zeicher S., Palumbo P.^[114], было показано, что у 9 детей в течение 3-х первых лет жизни скорость укорочения теломеров клеток крови оказалась в 4 раза выше, чем у взрослых, соответственно 270 bp и 50 bp в год.

Минимальная длина теломера, при которой еще возможно деление в нормальных тканях — 2 kb^[115]. Исходя из данных, полученных при культивировании фибробластов, об укорочении теломеров на 50 bp при каждом делении^[115], нетрудно рассчитать, сколько митотических циклов может пройти клетка, имея ту или иную длину теломера, детерминированную уровнем клеточной дифференцировки, а также генетикой и возрастом индивидуума^[116: 117]. Это число может быть значительным, составляя, например, для клеток плода и новорожденного 60-80 удвоений^[118]. Такие представления и дали основание считать теломеры «биологическими часами» клеток. Предполагается, что укорочение теломера является механизмом, определяющим число клеточных делений, предшествующих старению.

«Репродуктивное» старение клеток человека может быть разделено на 2 стадии: M1 (стадия смертности 1) и M2 (стадия смертности 2)^[119]. Стадия M1 наступает после значительного укорочения теломерных участков хромосом, контролируется супрессорными белками p53 и pRb и выражается в «аресте» клеток, т.е. выходе их из митотического цикла временно или вследствие конечной дифференцировки. При недостаточности функциональной активности этих белков происходит критическое укорочение теломеров и наступает стадия M2, включающая механизм апоптоза.

Противостоит этим событиям теломераза — рибонуклеопротеиновый фермент, который используется в качестве матрицы для синтеза TTAGGG последовательностей в концевых участках хромосом, препятствуя таким образом укорочению теломеров^[120: 121].

Теломераза — нормальный компонент зародышевых и самообновляющихся тканей, но в большинстве соматических клеток отсутствует или присутствует в редуцированном количестве^[122: 123].

Содержание теломеразы в клетках крови представлено в табл.4.4.2.
Табл. 4.4.2. Уровень активности теломеразы в нормальных гемопоэтических клетках (+ - +++ степень выраженности по данным, представленным в цитируемых источниках).

Костный мозг					Авторы
Стволовые клетки			[124] [125]		
Полипотен- тные	Ранние предше- ственники	CD-34 негативные			
+	++				
+	++	+			
Периферическая кровь					
Т-лимфоциты		В-лимфоциты	Моноциты	Гранулоциты	Авторы
+		+	+	+	[126]
IL-2 R+	IL-2 R-				
+	+	+	+		[124]
CD-4+	CD-8+				[127]
+	+				
Лимфатические узлы/миндалины					
Т-лимфоциты		В-лимфоциты		Авторы	
		Покоящиеся	Зародышевых центров		
+		+	+++	[128]	
CD-4+	CD-8+			[127]	
++	++				
Тимус					
Т-лимфоциты					[127]
CD4+CD8-	CD4-CD8+	CD4+CD8-	CD4-CD8-		
+++	++	+++	+++		

Система кроветворения является быстро обновляющейся тканью. Теломераза обнаруживается практически во всех дифференцированных клетках. Находясь там в количестве, недостаточном для иммортализации, теломераза способствует, по-види-мому, замедлению темпа укорочения теломеров. В полипотентных стволовых клетках содержание теломеразы ниже, чем в коммитированных предшественниках. Это казалось бы хорошо согласуется с тем, что в популяции стволовых клеток доля делящихся клеток много меньше, чем в популяции предшественников. Однако связы-вать активность теломеразы с пролиферативным статусом клеток было бы боль-шим упрощением, поскольку известно, например, что активно пролиферирующие CD34-негативные предшественники имеют уровень активности теломеразы, сопос-тавимый с низко пролиферирующей популяцией стволовых клеток [125].

При культивировании CD34+ клеток активность теломеразы стимулируется смесью колониестимулирующих факторов, а цитокины, стимулирующие апоптоз (на-

пример, TGF β_1), и высокие концентрации ретиноевой кислоты, напротив, снижают активность теломеразы^[113]. Митогенная стимуляция лимфоцитов повышает примерно в 20 раз активность теломеразы, которая постепенно снижается до исходного уровня через 5-10 последовательных удвоений^[129].

Приведенные выше данные заставляют предположить существование эндогенного репрессора теломеразы. Особенно демонстративно это следует из экспериментов по гибридизации теломер-позитивных и теломер-негативных клеток: в гибридных клонах, способных к пролиферации, уровень теломеразы оказался очень низким или не выявлялся вовсе^[130].

Действительно, локус, ответственный за репрессию теломеразы, был выявлен на коротком плече хромосомы 3^[131]. Делеция региона 3p21 часто наблюдается при мелко-клеточном и не мелкоклеточном раке легкого и сопровождается увеличением активности теломеразы^[132]. Более того, введение нормальной хромосомы 3 в опухолевую клеточную линию с высокой активностью теломеразы вызывает ее снижение, постепенное укорочение теломеров и остановку пролиферации через 100 дней культивирования^[131]. Эти данные являются основанием для следующих предположений:

- Супрессию теломеразы можно рассматривать как потенциальный способ подавления опухолевого роста;
- «Репродуктивное» старение клеток и, напротив, их иммортализация являются сложными многоступенчатыми процессами.

Действительно, в процессах иммортализации клеток, вместе с теломеразой, участвуют факторы репрессии теломеразы и гены клеточного старения, картированные на 4, 1 и 7 хромосомах^[133;134;135]. Схематически это представлено на рис.4.4.1. Иммортализация клеток, лежащая в основе наработки опухолевого клона, соответствует рисунку «d» на схеме, является многофакторным процессом, в результате которого, в частности, происходит и повышение активности теломеразы.

Высокая активность теломеразы характерна для большинства злокачественных опухолей. В табл.4.4.3 суммированы данные литературы о частоте высокой теломеразной активности при злокачественных новообразованиях различной локализации. Учитывались результаты определения теломеразной активности методом амплификации теломерных последовательностей в PCR-реакции (TRAP-метод). Метод этот отличается большой чувствительностью, недостатком его является возможность только полуколичественной оценки.

Табл. 4.4.3. Частота высокой активности теломеразы при раках разной локализации [136].

Вид опухоли Частота высокой активности теломеразы (%) Авторы		
Гемопоэтическая ткань*		
Миелома	100	[137]
Лимфома		
· низкая злокачественность	86	[137]
· высокая злокачественность	100	[138]
МДС	67	[138]
ХМЛ:		
· хроническая фаза	71	[126,140]
· фаза ускорения	33	[126]
· бластный криз	100	[140]
ХЛЛ:		
· ранняя фаза	14	[139]
· поздняя фаза	57	[139]
ОПЛ	100	[126]
ОЛЛ	80	[126]
ОМЛ	73	[126,139,140,141]
Нервная ткань		
Ретинобластома	50	[142]
Глиобластома	75	[122,143,144]
Олигодендроглиома	100	[144]
Анапластическая астроцитомы	10	
Менингиома:		
· доброкачественная	17	
· атипичная	92	[144]
· злокачественная	100	
Нейробластома	94	[145]
Нормальная ретина/мозговая ткань	0	[123,142,143]
Почки/мочевой тракт		
Рак мочевого пузыря	92	[146]
Рак почки	83	[147,148]
Опухоль Вилмса	100	[122]
Нормальный эндотелий мочевого пузыря	0	[146]

Мужская половая сфера

Рак предстательной железы	90	[122,149]
Доброкачественная гипе рплазия простаты	5	[122,149]
Нормальные яички (плод/взрослый)	100	[149]
Нормальная простата	0	[123]
Зрелые сперматозоиды	0	[123]

Женская половая сфера

Аденокарцинома эндометрия	100	[30]
Рак шейки матки	100	[30]
Рак влагалища	100	[150]
Лейомиосаркома	100	[122,136]
Лейомиома	0	[122,136]
Яичники плода	100	[122]
Яичники взрослой женщины	33	[122,28]
Неоплодотворенное яйцо	0	[122,136]
Нормальный миометриум/ эндометриум	0	[122,136]

Грудная железа

Рак грудной железы in situ	75	[151,152]
Рак грудной железы (протока и доли)	88	[122,152]
Фиброаденома	28	[153]
Киста	0	[153]
Нормальная ткань	0	[122,153,]

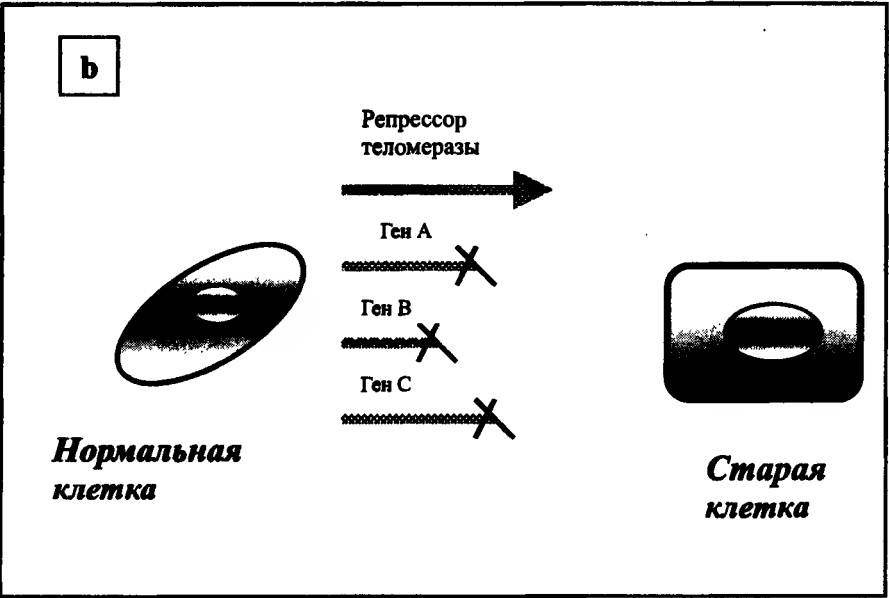
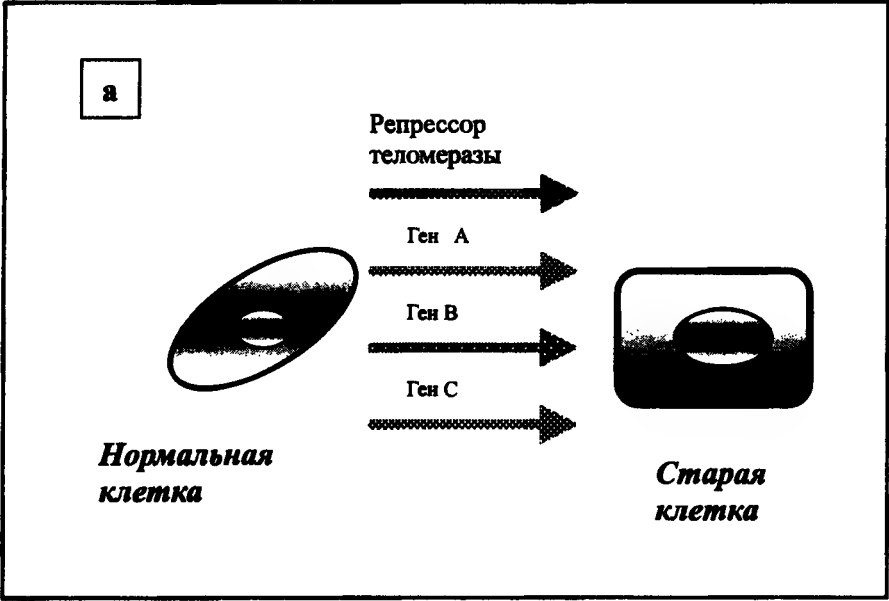
Печень

Рак печени	86	[122,154]
Гепатиты/цирроз	29	[154,155]
Нормальная ткань	0	[154,155]

Пищеварительный тракт

Рак желудка	85	[156,157]
Рак толстой кишки	89	[122,156,158]
Рак поджелудочной железы	95	[159]
Нормальная слизистая желудка	5	[156,157]

*- активность выше базового уровня содержания фермента в нормальных клетках крови.



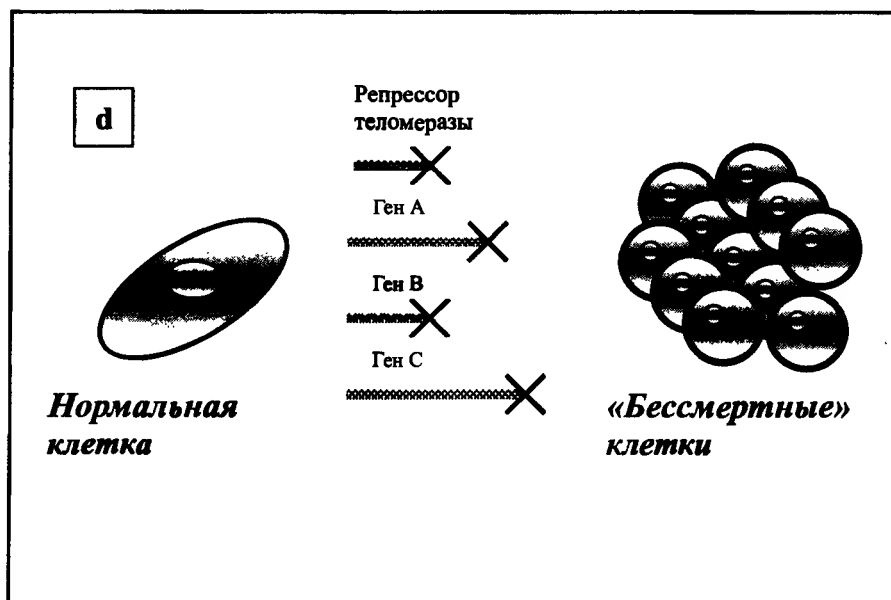
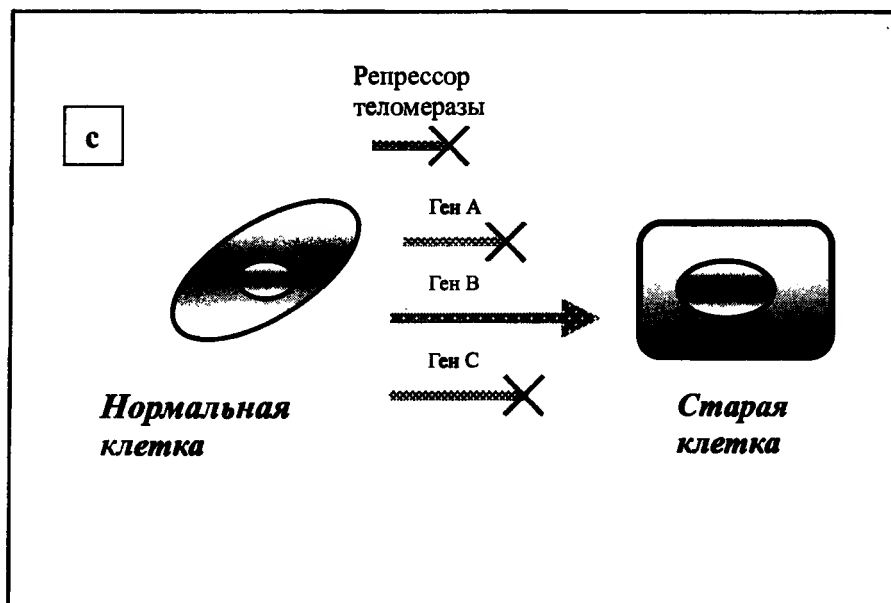


Рис.4.1. Пути старения клетки. Ген А, ген В, ген С – гены старения, картированные на хромосомах 4, 1, 7. Рисунок а – вариант старения клетки, когда работают все механизмы программы клеточного старения; программа продолжает выполняться при сохранении хотя бы одного из эффекторных механизмов старения (рис.б, с); условие иммортализации клетки – отключение всех механизмов старения (рис.д).

Приведенные данные показывают, что подавляющее большинство злокачественных опухолей характеризуется существенным повышением активности теломеразы. В клетках нормальных тканей, из которых исходит опухоль, активность теломеразы обычно отсутствует. Исключение составляют лишь стволовые кроветворные клетки, яички и яичники плода. Определение активности теломеразы успешно используется для дифференциальной диагностики и прогноза течения злокачественных новообразований [160; 161]. Для злокачественных заболеваний, исходящих из кроветворных клеток, характерным является нарушение механизма, обеспечивающего стабилизацию хромосом: укорочение теломеров ниже критического предела приводит к снижению теломеразной активности и остановке деления.

Большинство онкогематологических заболеваний отличает сочетание высокой активности теломеразы с резким укорочением теломерных участков хромосом (ниже 5 kb).

Механизм возникновения такой закономерности остается нерасшифрованным: либо высокая активность теломеразы в опухоли возникает в ответ на укорочение теломеров и является результатом извращения нормальных регуляторных механизмов, либо в опухоли сохраняется высокая теломеразная активность образующей ее клоногенной стволовой клетки, следствием чего и является чрезмерная потеря теломерных последовательностей.

Теломеразная активность опухолевых клеток способствует высокому пролиферативному потенциалу, а неполноценность теломеров при продолжающемся клеточном делении формирует генетическую нестабильность, вызывает дополнительные мутации и хромосомные aberrации, лежащие в основе опухолевой прогрессии.

Интересные данные были получены Ohyashiki Y., Iwama H., e.a.^[162]: при исследовании 93 больных с МДС у 35 пациентов было выявлено резкое укорочение теломеров. Именно в этой группе больных значительно чаще наблюдали низкую концентрацию гемоглобина, высокий процент бластных клеток, высокую частоту цитогенетических аномалий, чаще отмечалась лейкемическая трансформация.

Резкое повышение теломеразной активности (в 10-50 раз по сравнению с нормой) при ОМЛ, по мнению некоторых исследователей, является плохим прогностическим показателем и свидетельствует о лекарственной резистентности бластных клеток [163; 164].

Итак, теломер/теломеразная гипотеза старения и рака может быть сформулирована следующим образом:

- прогрессивное укорочение теломера во всех соматических клетках, включая стволовые клетки обновляющихся тканей, является нормальным механизмом — биологическими часами, регулирующими клеточное старение;
- сигналом для наступления клеточного старения является укорочение до критического уровня одного или нескольких теломеров в клетке;
- теломераза репрессирована в большинстве соматических клеток, любые

изменения в путях репрессии теломеразы вызывают реактивацию или повышение активности энзима;

- *активация теломеразы либо любой другой механизм стабилизации теломер в клетках опухоли является отличительным признаком всех иммортализованных популяций раковых клеток.*

4.4.2. Перспективы использования ингибиторов теломеразы в противоопухолевой терапии

Исходя из всего сказанного в предыдущем разделе, представляется вполне реальным, что подавление активности теломеразы, может стать новым перспективным направлением противоопухолевой терапии. Назначение антителомеразных агентов вслед за стандартной противоопухолевой терапией (хирургия, облучение, химиотерапия) могло бы снизить пролиферативный потенциал резидуальных опухолевых клеток и предотвратить развитие рецидива. Ингибиторы теломеразы могли бы также быть использованы для профилактики развития опухоли в группе пациентов высокого риска и в начальных стадиях рака для профилактики метастазирования.

В перспективности этого направления убеждают наблюдения над больными с особой формой нейробластомы у детей, при которой, несмотря на наличие метастазов, часто наступает спонтанная ремиссия. Отличительной особенностью этой формы нейробластомы является отсутствие активности теломеразы в опухолевых клетках ^[165].

В настоящее время можно прогнозировать развитие следующих направлений, рассчитанных на подавление теломеразной активности в опухолевых клетках:

- олигонуклеотидные антитела, преимущество которых заключается в том, что РНК-матрица теломеразы, обеспечивающая ее активное взаимодействие с теломером, легко может быть инактивирована связыванием с нуклеиновыми кислотами, в том числе и с олигонуклеотидными антителами ^[166].

- введение нормальной хромосомы 3, содержащей супрессор теломеразы, в опухолевые клетки; обнадеживающие результаты получены при введении хромосомы 3 в клеточные линии рака почки ^[167; 168] и рака грудной железы ^[169]: снижение теломеразной активности подтверждалось уменьшением содержания мессенжера РНК, кодирующего каталитический протеиновый фрагмент теломеразы (hTERT); прекращение роста произошло после 23-43 удвоений популяции;

- использование дендритных вакцин, стимулирующих образование цитотоксических Т-лимфоцитов к hTERT-фрагменту теломеразы; эффективность таких вакцин была подтверждена в иммунизации *ex vivo* клеточных линий, полученных от больных с раком предстательной железы ^[170].

Гипотетическим ограничением антителомеразной терапии может быть отсроченность циторедуктивного эффекта, так как остановка роста опухоли должна произой-

ти только после достижения теломером критически малой величины. Это ограничение в наименьшей степени касается опухолей, исходящих из кроветворной ткани, т.к. для них характерно изначально резкое укорочение хромосом. При других опухолях это может быть преодолено сочетанием с цитостатическими препаратами в начальный период терапии. Другим ограничением может стать токсическое воздействие на стволовые клетки самообновляющихся тканей и герментативные органы. Однако большая длина теломеров в клетках этих тканей позволяет считать, что циторедуктивный эффект в опухолевых клетках наступит раньше, чем в нормальных клетках-мишенях, а последующая отмена препарата приведет к восстановлению теломеразной активности нормальных клеток.

Практическое применение этого направления терапии требует дальнейших теоретических и экспериментальных исследований, но представляется весьма заманчивым.

Литература к очерку

1. Blagosklonny M. // *Leukemia*, 2000, 14, 1502-1518
2. Blagosklonny M. e.a. // *Int. J. Oncol.*, 1997, 11, 1165-1170
3. Winford-Thomas D. // *J. Pathol.*, 1999, 187, 100-111
4. Folkman J. // *N.Engl. J. Med.*, 1971, 285, 1182-1186
5. Folkman J. // *Ann. Surg.*, 1972, 175, 409-416
6. Shing Y., Folkman J., e.a. // *Science*, 1984, 223, 1296-1299
7. Folkman J., Kluksbrun M. // *Science*, 1987, 235, 442-447
8. Bikfalvi A., Savona C., e.a. // *Angiogenesis*, 1997, 1, 155-173
9. Bikfalvi A., Klein S., e.a. // *Endocr. Rev.*, 1997, 18, 26-45
10. Li V., Folkerth R., e.a. // *Lancet*, 1994, 344, 82-86
11. Nguyen M., Watanabe H., e.a. // *J. Ntl. Cancer Inst.*, 1994, 86, 356-361
12. Perz-Atayde A.R., Sallan S., e.a. // *Am. J. Pathol.* 1997, 150, 815-821
13. Dvorak H., Brown L., e.a. // *Am. J. Pathol.*, 1995, 146, 1029-1039
14. Ferrara N. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* // 1999, 237, 1-30
15. Fukumura D., Xavier R., e.a. // *Cell*, 1998, 94, 715-725
16. Davis S., Yancopoulos G. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1999, 237, 173-185
17. Holash J., Maisonpierre P., e.a. // *Science*, 1999, 284, 1994-1998
18. Brown P. // *Angiogenesis*, 1997, 1, 142-154
19. Galis Z., Muszynski M., e.a. // *Circ. Res.*, 1994, 75, 181-189
20. Johnson M., Kim H., e.a. // *J Cell Physiol.*, 1994, 160, 194-202
21. Folkman J. // *Mol. Med.*, 1995, 1, 120-122
22. Kerbel R. // *Carcinogenesis*, 2000, 21, 515-515
23. Hanahan D., Folkman J. // *Cell*, 1996, 86, 353-364
24. Dameron K., Bouck N. // *Science*, 1994, 265, 1582-1584
25. Rak J., Mitsuhashi Y. // *Cancer Res.*, 1995, 55, 4575-4580
26. Siemeister G., Weindel K., e.a. // *Cancer Res.*, 1996, 56, 2299-2301
27. Fiedler W., Graeven U., e.a. // *Blood*, 1997, 89, 1870-1875
28. Pruneri G., Bertolini F., e.a. // *British J. Cancer*, 1999, 81, 1398-1401
29. Rajkumar S., Fonseca R., e.a. // *Leukemia*, 1999, 13, 815-820
30. Vacca A., Ribatti D., e.a. // *Br. J. Cancer*, 1999, 79, 965-970
31. Ramakrishnan S., Olson T., e.a. // *Cancer Res.*, 1996, 56, 1324-1330
32. Shawver L., Lipson K., e.a. // *Drug Dev. Trends*, 1997, 2, 50-63
33. Seo M., Kwak N., e.a. // *Am. J. Pathol.*, 1999, 154, 1743-1753
34. Witte L, Hicklin D., e.a. // *Cancer Metastasis Rev.*, 1998, 17, 155-161
35. Schlaeppi J., Siemeister G., e.a. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* // 1999, 125, 336-342
36. Brooks P., Montgomeri A., e.a. // *Cell*, 1994, 79, 1157-1164
37. Borgstrom P., Nillan K., e.a. // *Cancer Res.*, 1996, 56, 4032-4039
38. Beckett R., Davidson A., e.a. // *Drug. Dev. Today*, 1996, 1, 16-26
39. Denekamp J. // *Br. J. Radiol.* // 1993, 66, 181-196
40. Kerbel R., Vioria-Petit A., e.a. // *Mol. Med.*, 1998, 4, 286-295
41. Teicher B. // In: *Antioangiogenic Agents in Cancer Therapy*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 277-316
42. Robbins P., Kawakami Y. // *Curr. Opin. Immunol.*, 1996, 8, 628-636
43. Molldrem J., Clave E., e.a. // *Blood*, 1997, 90, 2048-2055
44. Gao L., Bellantuono I., e.a. // *Blood*, 2000, 95, 2198-2203

45. Pardoll D. // Clin. Immunol. J., 2000, 95, 44-62
46. Huang A., Golumbek P., e.a. // Science, 1994, 264, 961-965
47. Boon T., van der Bruggen P. // J. Exp. Med., 1996, 183, 725-729
48. Sotomayor E., Borrello I., e.a. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 11476-11481
49. Gabrilovich D., Ciernik F., e.a. // Cell Immunol., 1996, 170, 101-110
50. Gabrilovich D., Nadaf S., e.a. // Cell Immunol., 1996, 170, 111-120
51. Kerrebijn J.D., Simons P., e.a. // Eur. Arch. Otorhinolaryngol., 1995, 252, 409-416
52. Gabrilovich D., Cunningham H., Carbone D. // J. Immunother., 1997, 19, 414-418
53. Gabrilovich D., Corak J., e.a. // Clin. Cancer Res., 1997, 3, 483-490
54. Gabrilovich D., Chen H., e.a. // Nat. Med., 1996, 2, 1096-1103
55. Oyama T., Ran S., Nadaf S., e.a. // J. Immunol., 1998, 160, 1224-1232
56. Pardoll D. // Clin. Immunol., 2000, 95, 44-62
57. Rouard H., Leon A., e.a. // J. Immunol. Methods, 2000, 241, 69-81
58. Schadendorf D., Paschen A., Sun Y. // Immunol. Lett., 2000, 74, 67-74
59. Golumbek P., Azhari R., e.a. // Cancer Res., 1993, 53, 5841-5844
60. Ohnishi H., Yasukawa. // Blood, 2000, 95, 286-293
61. Maccubbin D., Wing K., e.a. // Cancer Res., 1992, 52, 3572-3576
62. Nigam A., Yacavone R., e.a. // Int. J. Oncol., 1998, 12, 161-170
63. Anderson L., Savary C., Mullen C. // Blood, 2000, 95, 2426-2433
64. Владимирская Е.Б., Кошель И.В., Курмашов В.И. // Пробл. гемат. пер. крови, 1971, 12, 6-10
65. Владимирская Е.Б. // В кн.: Острые лейкозы и гипоплазии кроветворения у детей. М., 1985, 112-132
66. Lampkin B. e.a. // J. Clin. Invest., 1971, 50, 2204-2214
67. Mauer A.M. // Haematologica, 1975, 60, 394-399
68. Wantzin G., Karle H., Killmann S. // Br. J. Haematol., 1976, 32, 283-289
69. Ernst P. // Dan. Med. Bull., 1976, 19, 271-284
70. Владимирская Е.Б. // В кн.: Острые лейкозы и гипоплазии кроветворения у детей. М., 1985, 100-112
71. Lajtha L. // Blood cells, 1981, 7, 45-63.
72. Greenberg M., Chanana A., e.a. // Lab. Invest., 1972, 26, 245-252
73. Скобин В.В. // Гематол., трансфузиол., 1999, 44, 34-37
74. Clarkson B., Strife A., e.a. // Cancer, 1970, 26, 1-19
75. Mauer A. // Curr. Probl. Cancer, 1977, 2, 1-46
76. Bettelheim., Valent P., Andreef M., et al. // Blood, 1991, 77, 700-711.
77. Zina Ben-Ishay, Prindel G., Sharon S. // Leuk. Res., 1999, 15, 321-325.
78. Buchner T. // Acute Leukemia IV. Prognostic factors and Treatment Strategies, 1993, Berlin.
79. Estey E., e.a. // Blood, 1992, 79, 2246-2255
80. Archimbaud E., Fenaux P., e.a. // Leukemia, 1993, 7, 372-377
81. Senderowicz // Leukemia, 2001, 15, 1-9
82. Morgan D. // Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 1997, 13, 261-299
83. MacLachlan T., e.a. // Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr., 1995, 5, 127-156
84. Hirama T., Koefler H. // Blood, 1995, 86, 841-854
85. Hirama T., Akashi M., Koefler H. // EHA, Educational book, 2000, 146-151
86. Hu X., Zuckerman K. // Leukemia and Lymphoma, 2000, 38, 235-246
87. Luo R., Postigo A., Dean C. // Cell, 1998, 92, 463-473
88. DeGregori J., e.a. // Genes Dev., 1995, 9, 2873-2887
89. Waga S., Walsh K. // Nature, 1994, 369, 574-578
90. Shiohara M., e.a. // Blood, 1994, 84, 3781-3784

91. Firpo E., Koff A. // *Molecular and Cellular Biol.*, 1994, 14, 4889-4891
92. Lloyd R.V., e.a. // *Am. J. Pathol.*, 1999, 154, 313-323
93. Matsuoka S., e.a. // *Genes Dev.*, 1995, 9, 650-662
94. Herman J., Civin C., Issa J. // *Cancer Res.*, 1997, 57, 837-841
95. Quesnel B., e.a. // *Blood*, 1998, 91, 2985-2990
96. Dyson N. // *Genes Dev.*, 1998, 12, 2245-2262
97. Zhang H., Postigo A., Dean D. // *Cell*, 1999, 97, 53-61
98. Senderowicz A., Sausville E. // *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, 92, 376-387
99. Sausville E., e.a. // *Ann NY Acad. Sci.*, 2000, 910, 207-221
100. Sausville E., Zacharevitz D., e.a. // *Pharmacol Ther.*, 1999, 82, 285-292
101. Akiyama T., Shimizu, e.a. // *Anticancer Drugs*, 1999, 10, 67-78
102. McClintock B. // *Zea mays. Genetics*, 1994, 26, 134-282
103. Blackburn E. // *Cell*, 1994, 77, 621-623
104. Moysis R., Buckingham J., Gram L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 1988, 85, 6622-6626
105. Hatakeyama S., Fujita K., e.a. // *Blood*, 1998, 91, 1514-1519
106. Оловников А.М. // *Доклады Акад. Наук СССР*, 1971, 201, 1496-1499
107. Watson J. // *Nature New Biol.*, 1972, 239, 197-201
108. Greider C. // *Fnn. Rev. Biochemistry*, 1996, 65, 337-365
109. Harley C., Vaziri H., e.a., 1992, 27, 375-381
110. Harley C., Futcher A., Greider C. // *Nature*, 1990, 345, 458-461
111. Counter C., Gupta G., Harley C., e.a. // *Blood*, 1995, 85, 2315-2320
112. Norrback K., Roos G. // *Europ. J. Cancer*, 1997, 33, 774-780
113. Engellhard M., Kumar R., e.a. // *Blood*, 1997, 90, 182-193
114. Zeicher S., Palumbo P., e.a. // *Blood*, 1999, 93, 2824-2830
115. Levy M., Allsop R., e.a. // 1992, 225, 951-960
116. Vaziri H., Dragowska W., e.a. // *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 1994, 91, 9857-9860
117. Slaboom P.E., Droog S., e.a. // *Am. J. Hum. Genet.*, 1994, 55, 876-882
118. Campisi J. // *Europ. J. Cancer*, 1997, 33, 703-709
119. Wright W., Shay J. // *Exp. Geront.*, 1992, 27, 383-389
120. Greider C., Blackburn E. // *Cell*, 1985, 43, 405-413
121. Blackburn E. // *Ann. Rev. Biochem.*, 1992, 61, 113-129
122. Kim N.-W., Piatyszek M., e.a. // *Science*, 1994, 266, 2011-2015
123. Wright W., Piatyszek M. e.a. // *Dev. Genet.*, 1996, 18, 173-179
124. Hiyama K., Hirai Y., e.a. // *J. Immunol.*, 1995, 155, 3712-3715
125. Chui C., Dragovska W., e.a. // *Stem cells*, 1996, 14, 239-248
126. Broccoli D., Young J., de Lange T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 1995, 92, 9082-9086
127. Weng N.-P., Levine B., e.a. // *J. Exp. Med.*, 1996, 183, 2471-2479
128. Norrback K.-F., Dahlenborg K., e.a. // *Blood*, 1996, 88, 222-229
129. Bodnar A., Kim N., e.a. // *Exp. Cell Res.*, 1997, 228, 58-64
130. Wright W., Brasiskyte D., e.a. // *EMBO J.*, 1996, 15, 1734-1741
131. Ohmura H., Tahara H., e.a. // *Jpn. J. Cancer Res.*, 1995, 86, 899-904
132. Whang-Peng J., Kao-Shan C., e.a. // *Science*, 1982, 215, 181-182
133. Ning Y., Weber J., e.a. // *Proc Natl. Acad. Sci. Usa*, 1991, 88, 5635-5639
134. Hensler P., Annab L., Barret J. // *Mol. Cell Biol.*, 1994, 14, 2292-2297
135. Ogata T., Annaba L., e.a. // *Mol. Cell Biol.*, 1993, 13, 6036-6043
136. Shay J., Bacchetti S. // *Europ. J. Cancer*, 1997, 33, 787-791

137. Norrback K., Dahlenborg K., e.a. // *Blood*, 1996, 88, 222-229
138. Nilsson P., Mehle C., e.a. // *Oncogene*, 1994, 9, 3043-3048
139. Counter C., Gupta J., e.a. // *Blood*, 1995, 85, 2315-2320
140. Ohyashiki K., Ohyashiki J., e.a. // *Int. J. Oncol.*, 1996, 8, 417-421
141. Zhang W., Piatyszek M., e.a. // *Clin. Cancer Res.*, 1996, 2, 799-803
142. Gupta J., Han L., e.a. // *J. Natl. Cancer Inst.*, 1996, 88, 1152-1157
143. Allsopp R., Chang E., e.a. // *Exp. Cell Res.*, 1995, 220, 194-200
144. Langford L., Piatyszek M., e.a. // *Lancet*, 1995, 346, 1267-1268
145. Hiyama K., Hirai Y., e.a. // *Nature Med.*, 1995, 1, 249-255
146. Lin Y., Miyamoto H., e.a. // *Clin. Cancer Res.*, 1996, 2, 929-933
147. Mehle C., Piatyszek M., e.a. // *Oncogene*, 1996, 13, 161-166
148. Fiedler W., Dahse R., e.a. // *Int. J. Oncol.*, 1996, 9, 1227-1232
149. Sommerfeld H., Meeker A., e.a. // *Cancer Res.*, 1996, 56, 218-222
150. Counter C., Hirte H., e.a. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 2900-2904
151. Bednarek A., Sahin A., e.a. // *Clin. Cancer Res.*, 1997, 3, 11-16
152. Hiyama E., Gollahon L., e.a. // *J. Natl. Cancer Inst.*, 88, 116-122
153. Sogino T., Yoshida K., e.a. // *Int. J. Cancer*, 1996, 69, 301-306
154. Miura N., Norkawa I., e.a. // *Cancer Genetic Cytogen.*, 1997, 89, 75-91
155. Tahara H., Nakanishi T., e.a. // *Cancer Res.*, 1995, 55, 2734-2736
156. Tahara H., Kuniyoshi H., e.a. // *Clin. Cancer Res.*, 1995, 1, 1245-1251
157. Hiyama E., Yokuyama T., e.a. // *Cancer Res.*, 1995, 55, 3258-3262
158. Chadeneau C., Hay K., e.a. // *Cancer Res.*, 1995, 55, 2533-2536
159. Hiyama E., Kodama T., e.a. // *Cancer Res.*, 1996, 57, 326-331
160. Shay J., Gazdar A. // *J. Clin. Pathol.*, 1997, 50, 106-109
161. Langford L., Piatyszek M., Hu R., e.a. // *Hum. Pathol.*, 1997, 50, 110-117
162. Ohyashiki Y., Iwama H., e.a. // *Clin. Cancer Res.*, 1999, 5, 1155-1160
163. Zhang W., Piatyszek M., Kobayashi T., e.a. // *Clin. Cancer Res.*, 1996, 2, 799-803
164. Engelhardt M., Mackenzie K., e.a. // *Cancer Res.*, 2000, 60, 610-617
165. Hiyama E., Hiyama K., e.a. // *Nat. Med.*, 1995, 1, 249-255
166. Herbert D., Pitts A., Baker S., e.a. // *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, 96, 14276-14281
167. Ohmura H., Tahara H., e.a. // *Cancer Res.*, 1995, 55, 899-904
168. Horikawa I., Oshimura M., e.a. // *Mol. Carcinog.*, 1998, 11, 65-72
169. Guthbert A., Bond J., e.a. // *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999, 91, 37-45
170. Minev B., Hipp J., Firat H., e.a. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 4796-4801

Заключение

Конец XX века ознаменовался значительными успехами в лечении онкологических заболеваний. Решающую роль в этом, особенно при лечении диссеминированных опухолей, сыграла химиотерапия. Достижения химиотерапии до последнего времени были связаны с применением эмпирически разработанных высоко агрессивных программ полихимиотерапии, проведение которых обеспечивается мощной сопроводительной терапией.

В то же время бурное развитие молекулярной биологии, ставшей, по существу, языком современной медицинской науки, и стремление ученых применить накопленные знания в практической медицине привело к слиянию фундаментальных и клинических исследований во многих областях медицинской науки и, в первую очередь, в онкологии. Дальнейшее совершенствование противоопухолевой терапии возможно только при использовании широкого арсенала молекулярно-генетических, иммунологических и гематологических исследований.

Оказалось, что у химиотерапии есть существенные резервы, связанные с преодолением лекарственной резистентности и индивидуальным подбором терапии на основании тестирования чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам *ex vivo*. Кроме того, молекулярно-генетические исследования сигнальных путей основных программ, управляющих жизнью опухолевых клеток, определили новые пути и новые лекарственные средства для избирательного подавления опухолевого роста, и тем самым, новые перспективы для оптимизации химиотерапии без дальнейшего повышения ее интенсивности. Появились также возможности генотерапии, делающие опухолевые клетки наиболее чувствительными, а нормальные — невоисприимчивыми к действию цитотоксической терапии.

Детальное изучение биологии опухолевой клетки на современном научно-методическом уровне открыло совершенно новые перспективы в противоопухолевой терапии. Наши представления о кинетике опухолевых клеток значительно углубились. Выявление генов и внутриклеточных белков, ответственных за прохождение клетками митотического цикла, особенности взаимодействия их в опухолевых клетках совершенно изменили представления о кинетической тактике лечения и ее возможностях.

Все больше расширяются представления о природе и механизмах действия цитокинов и ростовых факторов. Изучение молекулярных механизмов внутриклеточной трансдукции цитокиновых сигналов, связь их с программой апоптоза открывают новые перспективы использования этих факторов, их рецепторов и сигнальных молекул в противоопухолевой терапии.

Молекулярная генетика расшифровала механизм старения клеток, связанный с функцией теломеров и теломеразы, и те нарушения в этих механизмах, которые обеспечива-

ют иммортализацию опухолевых клеток. Намечены новые пути избирательного подавления роста опухолевых клеток путем подавления их теломеразной активности.

До сих пор тактика химиотерапии была нацелена на тотальное уничтожение опухолевой массы путем «массированного рассыпного огня», под ударами которого страдают нормальные клетки почти в той же степени, что и опухолевые. В настоящее время наметилась возможность точечных ударов по узловым механизмам, избирательно обеспечивающим переживание и экспансию опухолевых клеток.

Появились и совсем иные пути уничтожения опухолевого роста, как бы в обход опухолевых клеток, без учета их метаболических особенностей и степени чувствительности к химиотерапии. Это касается прежде всего методов, направленных на подавление опухолевого неоангиогенеза, поддерживающего рост опухоли и ее метастазирование.

Кардинальным образом изменилась противоопухолевая иммунотерапия, отражающая современные представления о клеточной кооперации в формировании иммунного ответа. Ведущая роль при этом отводится специально «обученным» макрофагам, так называемым «дендритным» клеткам. Созданию и клиническим испытаниям новых дендритных вакцин посвящены исследования многих коллективов иммунологов, гематологов и онкологов.

XXI век начинается с нового прорыва в противоопухолевой терапии, обеспеченного достижениями фундаментальных исследований XX века. Мы снова в начале пути, открыты новые перспективы, и это помогает с оптимизмом смотреть в будущее.

Оглавление:

Вступление	3
Очерк 1. Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста	5
1.1. Механизмы апоптотической смерти клеток	7
1.2. Сигнальные пути апоптоза	10
1.3. Модель апоптоза	21
1.4. Роль апоптоза в развитии опухолевого роста	24
1.5. Апоптоз и противоопухолевая терапия	26
1.6. Новая стратегия противоопухолевой терапии	28
Литература к очерку	30
Очерк 2. Ростовые факторы в регуляции кроветворения и формировании опухолевого роста	33
2.1. История. Номенклатура. Классификация	33
2.2. Происхождение и функция цитокинов	36
2.3. Структура и функция цитокиновых рецепторов	39
2.4. Активация цитокинового рецептора	42
2.5. Передача цитокинового сигнала	44
2.6. Механизмы реализации регулирующей роли цитокинов в кроветворении	46
2.7. Ростовые факторы и апоптоз кроветворных клеток	48
2.8. Ростовые факторы и опухолевый рост	49
2.9. Перспективы использования механизмов цитокиновой регуляции жизни клетки для подавления опухолевого роста	52
Литература к очерку	56
Очерк 3. Резистентность опухолевых клеток к химиотерапии при онкогематологических заболеваниях	59
3.1. Проникновение препарата в опухолевую клетку	60
3.2. Наличие внутриклеточных мишеней для действия препаратов	61
3.3. Внутриклеточная трансформация в активную форму	61
3.4. Достижение адекватной внутриклеточной концентрации	63
3.5. Способность клеток к апоптозу	64
3.6. Пути преодоления лекарственной резистентности	70
Литература к очерку	71

Очерк 4. Новые пути противоопухолевой терапии	73
4.1. Опухолевый неоангиогенез	74
4.1.1. Стимуляторы неоангиогенеза	75
4.1.2. Ингибиторы неоангиогенеза	76
4.1.3. Взаимосвязь ангио- и туморогенеза	77
4.1.4. Роль неоангиогенеза в развитии лейкозов и лимфом	78
4.1.5. Основные принципы и перспективы терапии	79
4.2. Противоопухолевая вакцинация	80
4.3. Кинетическая тактика противоопухолевой терапии	84
4.3.1. Регуляция митотического цикла в нормальных и опухолевых клетках	86
4.3.2. Медикаментозная модуляция кинетики опухолевого роста	89
4.4. Теломер и теломераза в канцерогенез	92
4.4.1. Роль теломера и теломеразы в регуляции опухолевого роста	92
4.4.2. Перспективы использования ингибиторов теломеразы в противоопухолевой терапии	101
Литература к очерку	103
Заключение	107

Лицензия ИД № 02365 от 17.07.2000 г.

Заказ № 2768. Тираж 1500.

Формат издания 70x1001/16. 7 п.л.

Отпечатано с готовых диапозитивов
в ГУП «Псковская областная типография»
180007, г. Псков, Рижский пр., 17.